

NASIE NIE SEKSOWANE. PRZYCZYNY OBNIŻONEJ PŁODNOŚCI I MOŻLIWOŚCI PRECYZYJNEJ OCENY JAKOŚCI*

Piotr Gogol

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,
32-083 Balice k. Krakowa

Zastosowanie nasienia seksowanego jest bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem dla hodowców bydła, którzy chcą zdecydowanie zwiększyć ilość rodzących się cieliczek w stadzie. Obecnie odsetek uzyskiwanych cieląt płci żeńskiej po inseminacji frakcją X nasienia seksowanego wynosi około 90%. Technologia seksowania nasienia jest stale udoskonalana, jednak w przypadku jego użycia skuteczność inseminacji (płodność) jest wciąż niższa w porównaniu z nasieniem konwencjonalnym. Główną przyczyną jest obniżona jakość plemników, które w trakcie seksowania są narażone na oddziaływanie czynników stresowych o charakterze technologicznym. W związku z tym sprawą niezwykle istotną jest możliwość precyzyjnego określania ich jakości in vitro. Standardowe metody oceny plemników, takie jak ruchliwość, morfologia czy przeżywalność, posiadają znaczne ograniczenia, a ponadto ich wyniki tylko do pewnego stopnia korelują ze zdolnością plemników do zapłodnienia. Z tego powodu konieczne jest zastosowanie nowoczesnych metod oceny nasienia, które będą stanowić bardziej precyzyjną podstawę do określenia płodności nasienia in vivo.

Słowa kluczowe: seksowane nasienie, płodność, bydło

Zainteresowanie metodami rozdziału plemników zwierząt notuje się od czasu szerokiego wprowadzenia inseminacji do praktyki hodowlanej bydła. Początkowo zasadniczą barierą pozostawał brak wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji „płci” plemników, a także możliwości skutecznego odseparowania rozpoznanych już frakcji. U większości gatunków ssaków chromosom Y jest najmniejszym bądź jednym z najmniejszych elementów w całym komplecie. Większość metod stosowanych dotąd do rozpoznawania plemników niosących chromosomy X i Y polegała na wykorzystaniu różnic budowy i wielkości pomiędzy tymi dwoma chromosomami.

Od pewnego czasu największe zainteresowanie budzi możliwość rozdziału plemników przy pomocy cytometrii przepływowej. Pomysł jej wykorzystania do rozdziału

*Praca finansowana z działalności statutowej IZ PIB, zadanie nr 01-19-06-11.

nasienia według „płci” narodził się na początku lat 80-tych, kiedy Pinkel i in. (1982) stwierdzili możliwość dokonania precyzyjnego pomiaru DNA oraz różnic jego zawartości pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X lub Y. Barwili oni utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków bromkiem etydy, mitramycyną lub DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Podobne badania z wykorzystaniem fluorochromu Hoechst 33342 (bisbenzimidazol) przeprowadzili Keeler i in. (1983). Barwnik ten, stosowany obecnie w pracach nad sortowaniem nasienia, łatwo przenika przez nieuszkodzone błony żywych komórek, łączy się stechiometrycznie z DNA w okolicach par zasad A-T, a wzbudzany światłem ultrafioletowym fluoryzuje w paśmie 450nm.

W pełni skutecznego rozdziału plemników dokonano w końcu lat 80-tych na nasieniu królika (Johnson i in., 1989). Reanaliza nasienia świeżego, barwionego Hoechstem 33342 wykazała, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich” oraz 81% w przypadku „męskich”. Rozdzielone plemniki wprowadzane były chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano około 28% wykotów, a potomstwo urodzone po inseminacji frakcją X było w 94% płci żeńskiej, natomiast po inseminacji frakcją Y w 81% męskie. Nieco gorsze rezultaty osiągnięto, sortując nasienie knura (Johnson, 1991). Również w tym przypadku skuteczność rozdziału oceniano na podstawie reanalizy i inseminacji chirurgicznej loch. Odsetek prosiąt płci żeńskiej po inseminacji „żeńską” frakcją wyniósł 74%, a płci męskiej po inseminacji „męską” frakcją – 68%. Wymienione prace wykazały, że istnieje realna możliwość rozdziału plemników pod względem determinowanej płci. Badania te wskazały jednak równocześnie na pewne istotne ograniczenia metody, z których najważniejszym była niewielka szybkość sortowania, osiągająca przeciętnie 100–200 komórek/sekundę. Na szybkość tę, oprócz niskiej wydajności samych sorterów, wpływał w sposób pośredni specyficzny płaski kształt główek plemników, powodujący zjawisko nierównej gęstości optycznej oraz swego rodzaju soczewkowania fluorescencji. Polega ono na uginaniu fluorescencji pochodzącej z wnętrza ku krawędziom główki plemnika. Fluorescencja nie jest zatem dystrybuowana równomiernie wokół całej główki, lecz soczewkowana w kierunkach zbliżonych do jej płaszczyzny. W przypadku analiz ilości DNA plemników, gdzie spodziewane różnice fluorescencji są niewielkie, zjawisko to ma skrajnie niekorzystny charakter. Płynące w punkcie analizy plemniki ustawiają się w sposób losowy w kierunku detektorów, zatem różnice intensywności fluorescencji wynikające z jej soczewkowania całkowicie „zagłuszają” różnice spowodowane rzeczywistą ilością DNA w komórce. Zjawisko to wymagało zastosowania specjalnych modyfikacji cytometrów przepływowych polegających na zmianie kształtu dyszy wylotowej i odczytywaniu fluorescencji DNA plemników równocześnie przez dwa detektory umieszczone pod kątem 90°. Zmodyfikowana w ten sposób dysza powodowała spłaszczenie strumienia cieczy z plemnikami do postaci wstęgi tak, by ich główki układały się w większości w tej samej płaszczyźnie, natomiast przeniesienie detektora pozwoliło na odczyt fluorescencji DNA również z pozostałej części plemników ustawionych „nieprawidłowo”.

Istotnym zagadnieniem pozostaje wpływ barwnika i wzbudzającego go światła laserowego na zdolność zapładniającą seksowanych plemników oraz późniejszy rozwój zarodka. Jak już wspomniano, fluorochromem stosowanym przy separacji nasienia jest Hoechst 33342, wzbudzany światłem UV o długości 350nm.

W przypadku barwionych tym związkiem plemników buhaja obserwowano nieznaczne obniżenie zdolności do zapłodnienia *in vitro*, jednak nie dotyczyło ono wszystkich badanych ejakulatów. Nie potwierdzono natomiast wysuwanych początkowo zastrzeżeń dotyczących uszkodzeń chromosomów, czy też wad potomstwa jako rezultatu zapłodnienia barwionymi plemnikami (Smorąg i in., 1993). Także badania wpływu wiązki światła UV na plemniki nie potwierdziły wcześniejszych zastrzeżeń (Guthrie i in., 2002).

W obecnie stosowanych cytometrach przepływowych, specjalizowanych w seksowaniu nasienia, wykorzystuje się omówione wyżej i udoskonalone modyfikacje razem z nowoczesną elektroniką. Pozwala to na osiągnięcie dobrej wizualizacji i separacji plemników X i Y przy przepływie do około 40 000 komórek na sekundę i uzyskanie w ciągu godziny około 15–20 mln plemników o czystości frakcji ponad 90%. Nasienie takie jest standardowo mrożone w słódkach, w porcjach zawierających 2–2,5 mln plemników. Po rozmrożeniu nasienia odsetek plemników o ruchu postępowym wynosi zwykle 50–60%. Zdolność zapładniająca nasienia seksowanego buhajów jest jednak niższa w porównaniu z nasieniem nieseksowanym z dwóch powodów. Jednym jest niższa liczba plemników w dawce inseminacyjnej, drugim uszkodzenia plemników, do jakich dochodzi w trakcie procesu sortowania. W przypadku większości buhajów istotną rolę odgrywają oba te czynniki, jednak nie ustalono do tej pory, który z nich odgrywa rolę większą (Seidel, 2014). Wykazano natomiast, że istnieją duże różnice w skuteczności inseminacji pomiędzy buhajami po użyciu niskich dawek plemników w seksowanym nasieniu (DeJarnette i in., 2010; 2011).

Badania nad powiązaniem jakości nasienia z jego zdolnością zapładniającą prowadzone są przy zastosowaniu coraz bardziej zaawansowanych technicznie metod. W dotychczasowych badaniach oceniano takie parametry, jak żywotność plemników (Gillan i in., 2008; Christensen i in., 2011), integralność błony komórkowej (Oliveira i in., 2013; Ahmed i in., 2016), pojemność (Alm i in., 2001; Gillan i in., 2008), stan akrosomu (Christensen i in., 2011), aktywność mitochondrialną (Ahmed i in., 2016), IVF (Ward i in., 2001), zdolność penetracji śluzu (Al Naib i in., 2011), poziom reaktywnych form tlenu (Sellem i in., 2015) oraz integralność chromatyny / DNA (Gillan i in., 2008; Ahmed i in., 2016). Mimo że wiele z tych badań wykazało korelacje z płodnością, żadna indywidualna cecha oceniana *in vitro* nie pozwala wystarczająco wiarygodnie przewidywać płodności. Wskazuje to na konieczność wprowadzenia podejścia wieloczynnikowego do tej kwestii. Potwierdzają to badania Sellema i in. (2015), którzy wykazali, że kombinacja wspomaganej komputerowo analizy ruchu plemników oraz oceny cytometrycznej (żywotność, stan chromatyny i akrosomów, stres oksydacyjny, aktywność mitochondrialna) może lepiej (choć w tym wypadku tylko w 40%) wyjaśnić różnice w płodności. Jest zatem oczywiste, że wymagane są dodatkowe badania uwzględniające nowe parametry jakościowe. Ostatnie wyniki badań (Holden i in., 2017) wskazują, że określenie zdolności zapładniającej nasienia seksowanego może wymagać zastosowania innych markerów niż w przypadku nasienia nieseksowanego. Przydatne mogą się tu okazać markery apoptotyczne, które były skorelowane ze zdolnością zapładniającą nasienia seksowanego *in vitro* (Zhao i in., 2014). Obiecujące wydaje się także zastosowanie metod chemiluminescencyjnych, których czułość znacznie przewyższa powszechnie stosowane metody fluorescencyjne (Gogol i in., 2009).

Charakter uszkodzeń plemników seksowanych nie został do tej pory wystarczająco wyjaśniony. Istnieje szereg przypuszczeń, w tym możliwość rozciągnięcia wtki plemnika w kropli tworzącej się w otworze dyszy, czy też spowolnienie progresji pierwszego cyklu komórkowego pomiędzy zapłodnieniem i pierwszym podziałem komórkowym, na skutek trwałego związania się barwnika Hoechst 33342 z plemnikiem (Seidel, 2012). Dotychczasowe badania wskazują na obniżoną ruchliwość plemników po seksowaniu, uszkodzenia w obrębie błony komórkowej oraz akrosomu i brak uszkodzeń chromatyny (Boe-Hansen i in., 2005; Suh i in., 2005; Mocé i in., 2006; Carvalho i in., 2010). Niestety wpływ uszkodzeń plemników na płodność może być tylko częściowo rekompensowany przez podniesienie ich liczby w dawce inseminacyjnej (DeJarnette i in., 2010, 2011). W prawidłowo zarządzanych stadach przy zastosowaniu dawki 2 mln plemników zazwyczaj uzyskuje się płodność na poziomie 75–85% w stosunku do grupy kontrolnej inseminowanej standardową dawką nasienia nieseksowanego. Wskutek tego najwyższe koszty, jakie ponosi hodowca z powodu użycia nasienia seksowanego, to niższa płodność.

Metoda regulacji płci poprzez rozdzielanie plemników X i Y znajduje coraz szersze zastosowanie w hodowli bydła. Mimo wyższych kosztów zakupu nasienia seksowanego i jego obniżonej płodności zyski hodowlane i ekonomiczne z racji uzyskiwania cieląt pożądanej płci są na tyle wysokie, że czynią tę technologię opłacalną. Należy się spodziewać, że w najbliższych latach również w Polsce nasienie seksowane buhajów będzie wykorzystywane na coraz szerszą skalę.

Piśmiennictwo

- Ahmed H., Andrabi S.M., Jahan S. (2016). Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, 86 (6): 1516–1522.
- Al Naib A., Hanrahan J.P., Lonergan P., Fair S. (2011). *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, 76: 161–167.
- Alm K., Taponen J., Dahlbom M., Tuunainen E., Koskinen E., Andersson M.A. (2001). Novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology*, 56: 677–684.
- Boe-Hansen G.B., Morris I.D., Ersboll A.K., Greve T., Christensen P. (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*, 63: 1789–1802.
- Carvalho J.O., Sartoric R., Machado G.M., Mourão G.B., Dode M.A.N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 74: 1521–1530.
- Christensen P., Labouriau R., Birck A., Boe-Hansen G.B., Pedersen J., Borchersen S. (2011). Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J. Dairy Sci.*, 94: 1744–1754.
- DeJarnette J.M., McCleary C.R., Leach M.A., Moreno J.F., Nebel R.L., Marshall C.E. (2010). Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J. Dairy Sci.*, 93: 4079–4085.
- DeJarnette J.M., Leach M.A., Nebel R.L., Marshall C.E., McCleary C.R., Moreno J.F. (2011). Effects of sex sorting and sperm dosage on conception rates in Holstein heifers. Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J. Dairy Sci.*, 94: 3477–3483.
- Gillan L., Kroetsch T., Chis Maxwell W.M., Evans G. (2008). Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 103: 201–214.

- Gogol P., Szcześniak-Fabiańczyk B., Wierzchoś-Hilczer A. (2009). The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod. Biol.*, 9 (1): 39–49.
- Guthrie H.D., Johnson L.A., Garrett W.M., Welch G.R., Dobrinsky J.R. (2002). Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol. Reprod. Dev.*, 61: 87–92.
- Holden S.A., Fernandez-Fuertes B., Murphy C., Whelan H., O’Gorman A., Brennan L., Butler S.T., Lonergan P., Fair S. (2017). Relationship between *in vitro* sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*, 87: 221–228.
- Johnson L.A. (1991). Sex preselection in swine: Altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Reprod. Dom. Anim.*, 26: 309–314.
- Johnson L.A., Flook J.P., Hawk H.W. (1989). Sex preselection in rabbit: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.*, 41: 199–203.
- Keeler K.D., Mackenzie N.M., Dresser D.W. (1983). Direct microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fertil.*, 68: 205–212.
- Mocé E., Graham J.K., Schenk J.L. (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66: 929–936.
- Oliveira L.Z., de Arruda R.P., de Andrade A.F., Celeghini E.C., Reeb P.D., Martins J.P. (2013). Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Anim. Reprod. Sci.*, 137: 145–155.
- Pinkel D., Lake S., Gledhill B.L., Van Dilla M.A., Stephenson D., Watchmaker G. (1982). High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry*, 3: 1–9.
- Seidel G.E. Jr. (2012). Sexing mammalian sperm – where do we go from here? *J. Reprod. Dev.*, 58: 505–509.
- Seidel G.E. Jr. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8: 160–164.
- Sellem E., Broekhuijse M.L.W.J., Chevrier L., Camugli S., Schmitt E., Schibler L., Koenen E.P.C. (2015). Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84 (9): 1447–1454.
- Smorąg Z., Ryńska B., Kańska L., Słota E. (1993). Fertilizability of bull spermatozoa stained for flow cytometry. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 11: 117–120.
- Suh T.K., Schenk J.L., Seidel G.E. Jr. (2005). High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64: 1035–1048.
- Ward F., Rizos D., Corridan D., Quinn K., Boland M., Lonergan P. (2001). Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, 60: 47–55.
- Zhao X.M., Ren J.J., Zhao S.J., Cui L.S., Hao H.S., Wang H.Y., Du W.H., Qin T., Liu Y., Wang D., Zhu H.B. (2014). Apoptosis-like events and *in vitro* fertilization capacity of sex-sorted bovine sperm. *Reprod. Domest. Anim.*, 49 (4): 543–549.

Zatwierdzono do druku 7 VIII 2018

PIOTR GOGOL

Sexed semen. Reasons for reduced fertility and the possibility of accurate quality assessment

SUMMARY

The use of sexed semen is highly attractive for cattle breeders who want to considerably increase the number of female calves born in a herd. Today, the proportion of female calves obtained after insemination with X-bearing sexed semen is around 90%. Semen-sexing technology is subject to continuous im-

provement, but it still offers lower conception rates (fertility) compared to conventional semen. The main reason is reduced quality of spermatozoa, which are exposed to technological stress factors during sexing. Therefore, it is of paramount importance that their *in vitro* quality can be accurately assessed. Standard sperm assessment methods such as motility, morphology and survival have many limitations, and their results correlate with sperm's fertilizing capacity only to a certain extent. For this reason, it is necessary to use modern semen assessment methods to provide a more accurate basis for determining semen fertility *in vivo*.

Key words: sexed semen, fertility, cattle