

Молекулярная генетика, динамика генофондов

УДК 636.2:636.018:591.463.1:57.086.8

ИНДЕКС ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК ХРОМАТИНА В СПЕРМАТОЗОИДАХ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА СЕМЕНИ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Б.С. ИОЛЧИЕВ¹, В.А. БАГИРОВ¹, П.М. КЛЕНОВИЦКИЙ¹,
В.П. КОНОНОВ¹, А.В. ТАДЖИЕВА²

К важнейшим условиям нормальной плодовитости самцов следует отнести биологическую полноценность сперматозоидов, в том числе сохранность в них наследственного материала. С использованием теста с акридиновым оранжевым (АО-тест) у быков-производителей разных пород проанализировали состояние ДНК в сперматозоидах, используя образцы замороженной и оттаянной спермы из коллекции лаборатории репродуктивной криобиологии Центра биотехнологии Всероссийского НИИ животноводства. Установлено, что степень фрагментации ДНК в сперматозоидах у быков-производителей, которая может зависеть от ряда факторов, колеблется от 0,96 до 80 %. По величине индекса фрагментации обследованные быки разделялись на четыре группы — с высокой (> 30,01 %), средней (от 10,01 до 30,0 %), умеренной (5,01-10,0 %) и минимальной (< 5,0 %) степенью фрагментации. Анализируемый признак подчинялся распределению Пуассона.

Ключевые слова: фрагментация ДНК, индекс фрагментации ДНК, хроматин, сперматозоиды, фертильность, тест с акридиновым оранжевым (АО-тест).

Keywords: DNA fragmentation, DNA fragmentation index, chromatin, sperm, fertility, acridine orange test (AOT).

Изучение причин бесплодия — одна из важных задач современной биологии. Эта проблема имеет ряд серьезных экономических, моральных, этических, социальных аспектов. Профилактика снижения фертильности актуальна как в медицине, так и в животноводстве, при этом исследования, выполненные на человеке и животных, взаимно дополняют друг друга. Известно, что в 50 % всех случаев бесплодие обусловлено нарушением фертильности мужских особей.

К важнейшим условиям нормальной плодовитости самцов следует отнести биологическую полноценность сперматозоидов, в том числе сохранность в них наследственного материала. Хроматин, составляющий основу хромосом, — структурная единица клеточного ядра. Базовыми компонентами хроматина клетки служат ДНК (30-40 %), гистоны (30-50 %) и негистоновые белки (4-33 %). Несмотря на то, что сперматозоиды представляют собой результат специфического развития соматических клеток, они значительно отличаются от последних. В частности, к таким особенностям относится строение хроматина в зрелых сперматозоидах (1).

Образование сперматозоидов включает три основных стадии: премейотическую, мейотическую и постмейотическую. В процессе созревания сперматозоидов их хроматин подвергается радикальной реорганизации, в результате которой обычные гистоны на 85 % замещаются специфическими основными белками — протаминами, что приводит к практически полному отсутствию нуклеосомной организации ДНК (1). Кроме замещения гистонов, происходит формирование дисульфидных мостиков между молекулами протаминов, в результате чего структура хроматина становится исключительно плотной, почти кристаллической.

На формирование сперматозоидов и упаковку генетического материала при созревании сперматозоидов влияют многие факторы. Появление различных повреждений ДНК может быть обусловлено возрастом особей,

инфекционными заболеваниями, наличием хронических или острых воспалительных патологий, загрязнением окружающей среды (2), температурным стрессом (3), облучением, незавершенным апоптозом (4), наконец, условиями хранения сперматозоидов (5), технологиями их замораживания и оттаивания (6) и т.п. В процессе сперматогенеза гаметы постепенно утрачивают способность к репарации ДНК, поэтому клетки с фрагментированной ДНК попадают в эякулят. Фрагментация может заключаться в разрывах как одной, так и обеих нитей ДНК (4, 7).

Установлено, что у человека фрагментация ДНК в сперматозоидах может быть причиной ранней эмбриональной смертности (3). По данным Y. Liu с соавт. (8), имеется тесная связь между состоянием хроматина в мужских половых клетках и их оплодотворяющей способностью. Установлено, что одной из причин идиопатического бесплодия служат разрывы ДНК в сперматозоидах. О негативном влиянии таких разрывов на фертильность мужских особей сообщали и другие авторы (9-14). Отрицательная корреляция между степенью фрагментации ДНК хроматина и фертильностью описана не только у человека, но и у животных (6, 15).

В то же время сперматозоиды с разрывами ДНК могут соответствовать всем требованиям стандартной спермограммы и способны оплодотворять яйцеклетки (9, 16). Однако результаты ряда исследований свидетельствуют, что существует предельный допустимый уровень фрагментации, превышение которого приводит к бесплодию. По мнению D.P. Evenson с соавт. (3), такое пороговое значение индекса фрагментации ДНК для мужчин составляет 30 %.

Для диагностики степени фрагментации ДНК в хроматине сперматозоидов используются прямые и непрямые методы. С помощью первых выявляются уже имеющиеся разрывы, тогда как вторые позволяют оценить, насколько ДНК половых клеток особи (по тем или иным причинам) предрасположена к фрагментации.

В задачу настоящего исследования входило обнаружение нарушений в хроматине и их количественная оценка с использованием цитохимического метода — окрашивания акридиновым оранжевым.

Методика. Объектом исследования была сперма быков-производителей разных пород ($n = 61$, коллекция лаборатории репродуктивной криобиологии Центра биотехнологии Всероссийского НИИ животноводства), замороженная в соломинках и гранулах.

Степень фрагментации ДНК в хроматине определяли в тесте с акридиновым оранжевым (АО-тест). Сперматозоиды освобождали от семенной жидкости центрифугированием при 6 тыс. об/мин в течение 5 мин, отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 6,8) и готовили мазки на предварительно обезжиренных стеклах. Мазки высушивали 10-15 мин при комнатной температуре и фиксировали 1 ч при 4 °С в смеси этанола с ацетоном (1:1). Препараты окрашивали в течение 7 мин в растворе акридинового оранжевого (0,19 мг/мл) при комнатной температуре. Окрашенные образцы исследовали с использованием люминесцентного микроскопа Люмам-ИЗ («ЛОМО», Россия). Для регистрации изображения применяли цветную видеокамеру Levenhuk model C-35 («Levenhuk Ltd.», США). Индекс фрагментации определяли как отношение числа сперматозоидов с поврежденной ДНК (клетки флуоресцируют в красной области спектра) к общему числу сперматозоидов. Документирование, расчеты и представление результатов выполняли с помощью отечественного пакета программы фирмы ООО «ВидеоТест» (г. Санкт-Петербург) (17).

Результаты. Акридиновый оранжевый (АО) относится к наиболее

эффективным и менее токсичным метакроматическим красителям. В окрашенных АО образцах спермы быков мы наблюдали клетки, флуоресцирующие в УФ-свете (λ возбуждения — 280-320 нм) в красном и зеленом участках спектра (рис. 1, см. 3-ю страницу обложки). Эти области флуоресценции характерны соответственно для фрагментированной и неповрежденной ДНК.

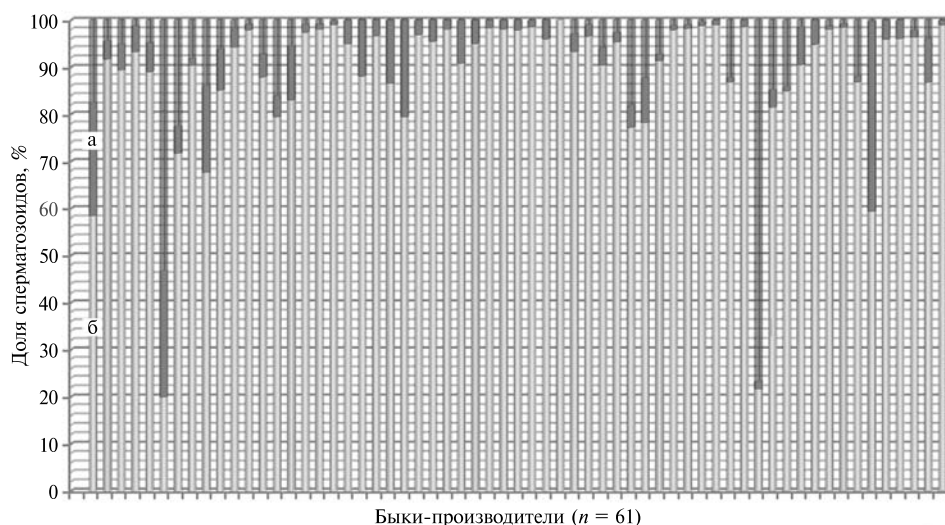


Рис. 2. Соотношение сперматозоидов с фрагментированной (а) и неповрежденной (б) ДНК в образцах спермы у обследованных быков-производителей (по результатам окрашивания акридиновым оранжевым).

В среднем по результатам исследования материала от быков-производителей (рис. 2) доля сперматозоидов с нарушениями в хроматине составила $11,90 \pm 1,97$ %. Однако индивидуальная сохранность генетического материала у особей варьировала очень значительно: доля сперматозоидов с разной степенью повреждения генетического материала колебалась от 0,96 до 80 % (см. рис. 2). Оказалось, что среди обследованных быков-производителей преобладают животные с низким и средним индексом фрагментации ДНК. Только у пяти особей (или у 8 % от всего поголовья), была обнаружена высокая частота нарушений в хроматине: индекс фрагментации ДНК в среднем равнялся $54,49 \pm 10,95$ %.

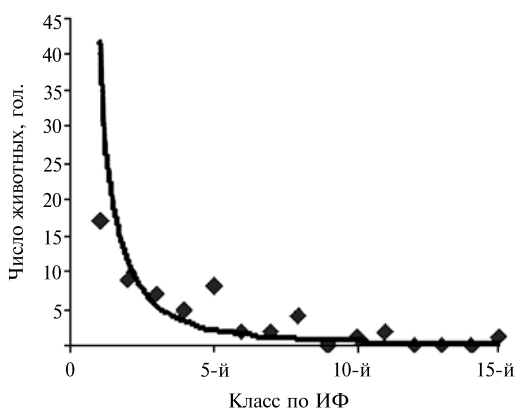


Рис. 3. Распределение обследованных быков-производителей по индексу фрагментации (ИФ) ДНК в сперматозоидах (по результатам окрашивания акридиновым оранжевым). Классы по индексу фрагментации приведены в порядке возрастания доли поврежденных сперматозоидов.

Наименьшее повреждение генетического материала в образцах спермы отмечали у 46 % животных: срок обследования образцов семени в среднем соответствовала величина индекса фрагментации $2,31 \pm 0,21$ %.

Результаты исследования набора образцов спермы, полученной от быков-производителей (рис. 3), свидетельствуют о достаточно высокой неоднородности материала (и тестируемых особей) по индексу фрагмента-

ции ДНК в сперматозоидах. В целом по группе образцов стандартное отклонение для анализируемого показателя составило 15,40, то есть этот признак подчиняется распределению Пуассона (см. рис. 3).

В зависимости от степени повреждения ДНК в сперматозоидах обследованных быков-производителей можно разделить на четыре группы — с высокой степенью фрагментации ДНК хроматина в половых клетках (индекс фрагментации > 30,01 %), со средней (от 10,01 до 30,0 %), умеренной (5,01-10,0 %) и минимальной (< 5,0 %) степенью фрагментации. Подобное распределение означает, что на основании результатов теста с акридиновым оранжевым (АО-тест) могут быть разработаны объективные критерии для оценки сохранности генетического материала в сперматозоидах при криоконсервации и характеристики репродуктивной функции у быков-производителей.

Таким образом, окрашивание акридиновым оранжевым позволяет выявить в популяции сперматозоидов быков-производителей два типа клеток (с нормальной и фрагментированной ДНК), различающихся по характеру флуоресценции в УФ-свете. Степень фрагментации ДНК в исследованных криоконсервированных образцах сперматозоидов у быков-производителей индивидуальна и значительно варьирует — от 0,96 до 80 %, что указывает на необходимость применения объективных критериев контроля за качеством спермы при хранении и состоянием репродуктивной функции у используемых производителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багиров В.А., Кононов В.П., Иолчиев Б.А., Кленовицкий П.М., Эрнст Л.К. Фертильность сперматозоидов и состояние хроматина: методы контроля (обзор). С.-х. биол., 2012, 2: 3-13.
2. Галимов Ш.Н., Амирова З.К., Галимова Э.Ф. «Кризис сперматозоида» и техногенное загрязнение окружающей среды. Проблемы репродукции, 2005, 2: 19-22.
3. Evenson D.P., Jost L.K., 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: 739-746.
4. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum. Reprod., 2003, 19(4): 331-345.
5. Вое-Нансен Г.В., Ерсболл А.К., Греве Т., Кристенсен П. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. Theriogenology, 2005, 63: 2006-2019.
6. Bochenek M., Herjan T., Okylski A., Smorag Z. Sperm chromatin abnormalities after semen sexing procedure — preliminary results. Havemeyer Foundation Monograph Series, 2006, 18: 13-14.
7. Seli E., Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum. Reprod. Update, 2005, 11(4): 337-349.
8. Liu Y., Baker H.W.G. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. Fertil. Steril., 1992, 58(6): 1178-1184.
9. Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum. Reprod., 2003, 18(5): 1023-1028.
10. Morris I.D., Hlott S., Dixon L., Brison D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum. Reprod., 2002, 17: 990-998.
11. Tomsu M., Sharma V., Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. Hum. Reprod., 2002, 17(7): 1856-1862.
12. Filatov M.V., Semenova E.V., Vorob'eva O.A. et al. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. Mol. Hum. Reprod., 1999, 5: 825-830.
13. Host E., Lindenberg S., Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 2000, 79: 559-563.
14. Larson K.L., DeJonge C.J., Barnes A.M. et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum. Re-

- prod., 2000, 15(8): 1717-1722.
15. Love C.C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. Anim. Reprod. Sci., 2005 Oct, 89(1-4): 39-45.
 16. Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 1998, 69: 528-532.
 17. Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Кленовицкий П.М., Кононов В.П., Насибов Ш.Н., Воеводин В.А. Компьютерная технология для оценки семени животных. Достижения науки и техники АПК, 2011, 9: 54-56.

¹Центр биотехнологии, ГНУ Всероссийский
НИИ животноводства Россельхозакадемии,
142132 Московская обл., пос. Дубровицы,
e-mail: baylar1@yandex.ru;

²ФГБОУ ВПО Российский университет
дружбы народов,
117198 ГСП, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Поступила в редакцию
4 мая 2012 года

THE INDEX OF DNA FRAGMENTATION IN SPERM CHROMATIN AS A CRITERIA TO PREDICT AN INDIVIDUAL FECUNDITY IN BULLS SIREs

B.S. Iolchiev¹, V.A. Bagirov¹, P.M. Klenovitskiy¹, V.P. Kononov¹, A.V. Tadzjeva²

S u m m a r y

A biological value of sperm, and, in particular, the intactness of genetic material are of the main importance for normal fecundity in males. To check the destructive changes of sperm chromatin, a DNA fragmentation index (FI) was estimated in frozen and thawed sperm samples of bulls of different breeds from the collection of the Laboratory of cryobiology, All-Russian Research Institute for Animal Breeding. The AO test with acridine orange (AO) as a staining agent was used. The index value was shown to depend on several factors and vary from 0.96 to 80 %. According to their FI values, the tested bulls were divided into four groups of high, middle, moderate and minimal fragmentation level with FI > 30.01 %, from 10.01 to 30.0 %, from 5.01 to 10.0 % and < 5.0 %, respectively. The FI parameter in tested samples was described with the Poisson function.

Научные собрания

VI НАУЧНАЯ ШКОЛА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКЕ «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦИЙ»

(16-19 октября 2012 года, г. Санкт-Петербург)



Организаторы:

кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербургский научный центр РАН, Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики РАН, Вавиловское общество генетиков и селекционеров, Российский фонд фундаментальных исследований, Российская академия сельскохозяйственных наук и Российская академия медицинских наук.

Тематика:

- Экологическая генетика и эволюция
- Популяционная генетика растений и надвидовых систем
- Генетические процессы в популяциях животных
- Популяционная генетика и экогенетические болезни человека

По окончании работы слушателям Школы будут выданы сертификаты и материалы с тезисами лекций, которые прочитают ведущие ученые страны.

Место проведения:

Санкт-Петербургский государственный университет (г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9) и Санкт-Петербургский научный центр РАН (г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 5).

По вопросам регистрации следует обращаться в оргкомитет Школы (school_2012@list.ru).

Контакты и информация:

school_2012@list.ru, www.ecolgenet.ru