

## POUŽITÍ OBRAZOVÉ CYTOMETRIE K ODHADU ŽIVOTNOSTI DVOJITĚ BARVENÝCH RYBÍCH SPERMÍÍ

### THE APPLICATION OF IMAGE CYTOMETRY TO VIABILITY ASSESSMENT IN DUAL FLUORESCENCE-STAINED FISH SPERMATOZOA

(Rozšířený abstrakt práce Flajšhans, M.; Cosson, J.; Linhart, O., 2004. The application of image cytometry for viability assessment of dual fluorescent - stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*. 28(12):955-959)

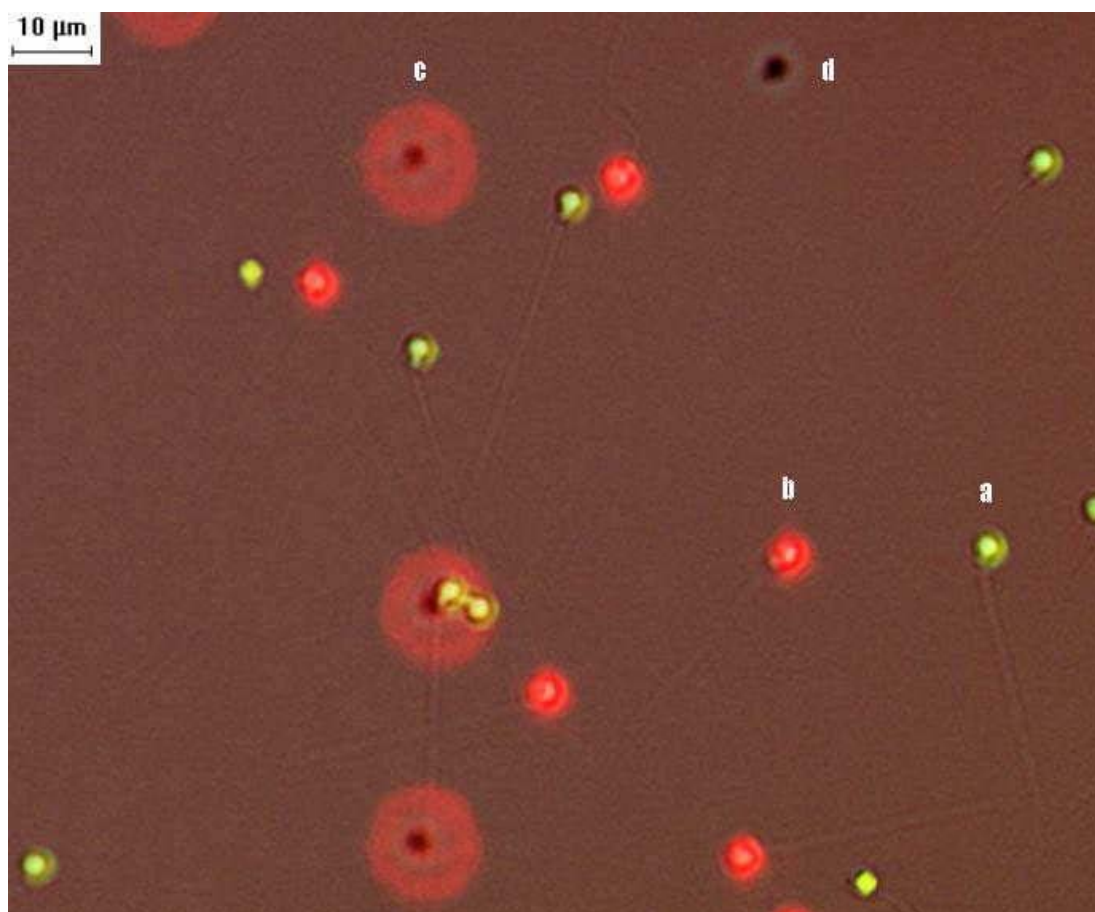
**FLAJŠHANS M., COSSON J., RODINA M., LINHART O.**

Životnost spermií se stanovuje s použitím fluorescenčních barviv SYBR 14 ke značení DNA živých buněk a propidium jodidu (PI) ke značení DNA degenerovaných buněk. Této techniky je hojně používáno ke stanovení životnosti spermií u člověka, laboratorních i hospodářsky významných druhů savců, ptáků i hmyzu, dosud však s hodnocením pomocí průtokové cytometrie. U ryb se stanovením životnosti spermií pomocí průtokové cytometrie zabývaly dosud jen dvě práce: Segovia a kol. (2000) u tilapie nilské, *Oreochromis niloticus* a Riley (2002) u chňapalů *Lutjanus campechanus* a *L. griseus*. Cílem této práce bylo ověřit hodnocení životnosti spermií s pomocí epifluorescence a obrazové cytometrie, tedy technik řádově levnějších a dostupnějších pro většinu laboratoří, zabývajících se biologií ryb. Dvojně barvení bylo provedeno u spermií čtyř druhů ryb (jeseter sibiřský, *Acipenser baerii*; kapr obecný, *Cyprinus carpio*; lín obecný, *Tinca tinca* a sumec velký, *Silurus glanis*; Tab. 1) a podíly živých/mrtvých spermií byly stanoveny epifluorescenční mikroskopií (Olympus BX60, 100W rtuťová výbojka Ushio, širokopásmový filtr Olympus MWB, objektivy Plan 20x nebo UPlanFl 40x) a obrazovou cytometrií (Olympus MicroImage v. 4). U každého vzorku bylo zaznamenáno 10 obrazů ve fázovém kontrastu a v epifluorescenci, odpovídající snímky byly přeloženy přes sebe a u přeložených snímků byly sledovány živé/mrtvé spermie představované zelenými/červenými fluorescenčními signály (Obr. 1). Počet a podíl živých/mrtvých spermií byl stanoven po dvojném prahování softwarem analýzy obrazu, který spočítal absolutní počty objektů a vypočítal jejich četnosti (Obr.2). Bylo zjištěno, že všechny hlavičky spermií v jedné rovině ostrosti byly označeny a emitovaly buď zelené nebo červené světlo. Průměrný počet spermií v 1 snímku u jesetera sibiřského, kapra obecného, lína obecného a sumce velkého byl v rozsahu 32-113, 61-105, 48-104 a 29-91. Odpovídající podíly živých spermií u těchto druhů byly v rozsahu 83.56-94.59%, 93.92-97.02%, 76.14-97.76% a 79.45-83.76%. Směrodatná odchylka nepřesáhla 5% průměru. Systém obrazové cytometrie, používající dvojně barvení SYBR 14 a PI byl shledán vhodným ke stanovení životnosti spermií sladkovodních druhů ryb.

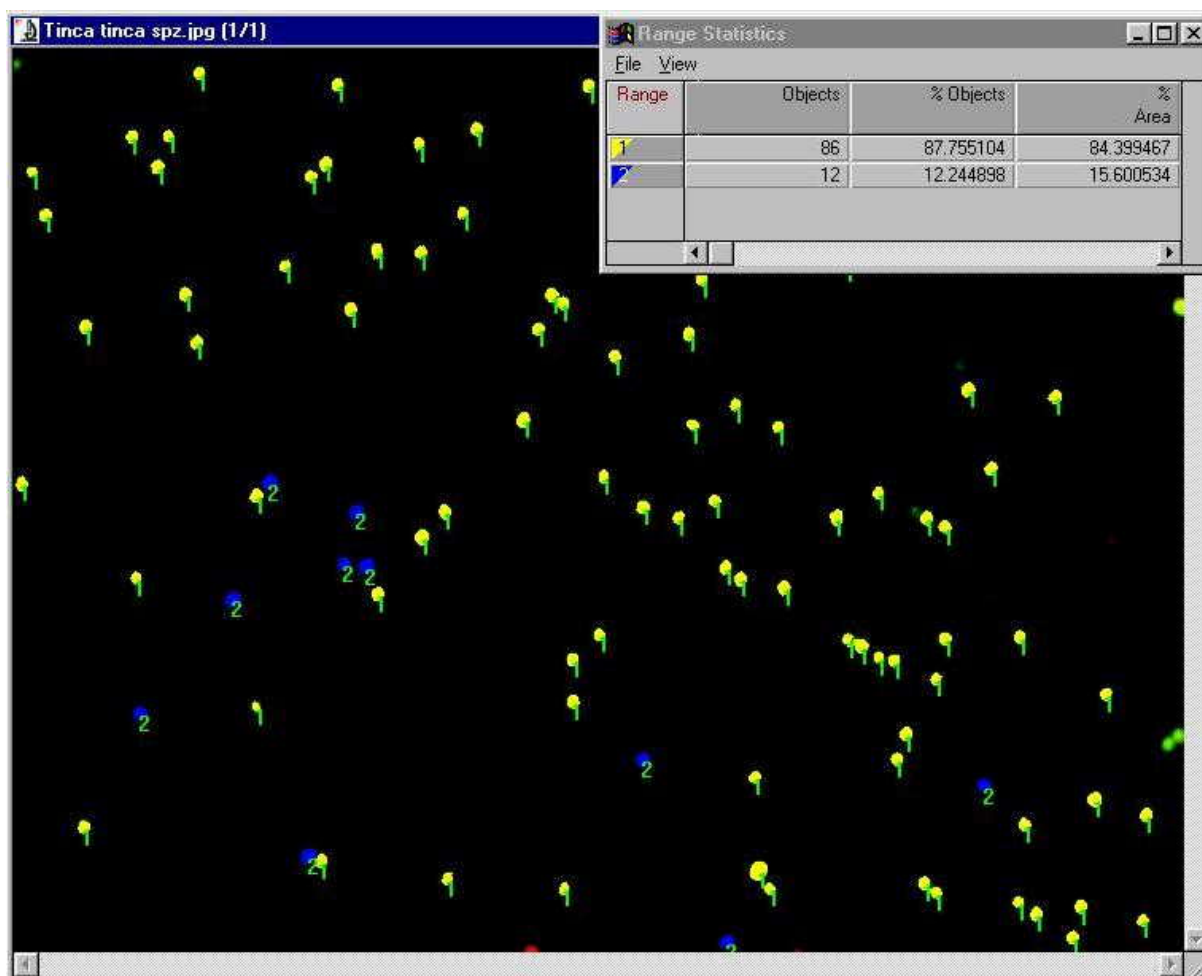
Tab. 1: Koncentrace spermií v nativním spermatu jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*), kapra obecného (*Cyprinus carpio*), lína obecného (*Tinca tinca*) a sumce velkého (*Silurus glanis*), složení druhově specifických imobilizačních roztoků a použitá ředění spermatu.

| Druh                    | Počet ryb (n) | Koncentrace nativních spermií ( $10^9$ ) | Ředění spermatu (sperma:IR) | Složení imobilizačního roztoku (IR)  | Odkazy                 |
|-------------------------|---------------|--|-----------------------------|--|------------------------|
| <i>Acipenser baerii</i> | 4             | 0.005-0.01                               | 1:25                        | 150 mM NaCl  |                        |
| <i>Cyprinus carpio</i>  | 6             | 14-17                                    | 1:10000                     | 128.3 mM NaCl,<br>2.7 mM KCl,<br>1.4 mM $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$ ,<br>2.4 mM $\text{NaHCO}_3$ | Kurokura et al. (1984) |
| <i>Tinca tinca</i>      | 6             | 7-10                                     | 1:5000                      | 180 mM NaCl,<br>2.7 mM KCl,<br>1.4 mM $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$ ,<br>2.4 mM $\text{NaHCO}_3$   | Rodina et al. (2002)   |
| <i>Silurus glanis</i>   | 6             | 0.5-1                                    | 1:500                       | 200 mM NaCl,<br>30 mM Tris-HCl, pH 7   | Linhart et al. (2002)  |

Obr. 1: Přeložený snímek spermií kapra obecného (*Cyprinus carpio*), ve fázovém kontrastu a ve fluorescenci po dvojném barvení SYBR14 a PI k rozlišení živých (a) a mrtvých (b) spermií. Zamlžený červený signál (c) náleží mrtvé spermii mimo rovinu ostrosti; živá spermie mimo rovinu ostrosti (d) nesvítí. Obraz byl sejmut s použitím mikroskopu Olympus BX 60 s objektivem Olympus UPlanFl 40x pomocí 3CCD barevné kamery Sony DXC-9100P a zpracován softwarem Olympus MicroImage v. 4.0. Měřitko 10  $\mu\text{m}$ . Obrázek dokumentuje nutnost nechat buňky sedimentovat na povrch skla, aby se dostaly do jedné roviny ostrosti.



Obr. 2: Výsledek stanovení živých (Třída 1, žlutá maska) a mrtvých spermií (Třída 2, modrá maska) lína obecného (*Tinca tinca*) v absolutních počtech objektů a vypočtených relativních četnostech. Objekty ležící na hranici snímku nebyly zahrnuty. Obraz byl zpracován softwarem MicroImage v. 4.0 pomocí dvojího prahování a funkce „Ranges Statistics“.



#### Poděkování:

Práce byla podporována projekty MŠMT ČR č. MSM 6007665809 a Kontakt ME 638.

#### Literatura:

- Blanco JM, Gee G., Wildt DE, Donoghue AM. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod* 2000; 63 (4):1164-71.
- Collins AM, Donoghue AM. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology* 1999; 51(8):1513-23.
- Collins AM. Survival of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *J Econ Entomol* 2000; 93 (3):568-71.
- Cosson J, Dreanno C., Billard R, Suquet M, Cibert C. Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors in "The Male Gamete: from Basic Knowledge to Clinical Applications" C. Gagnon Ed., Cache River Press; 1999 p. 161-86.
- Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ, Johnson LA. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poult Sci* 1995; 74 (7):1191-200.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 1994; 15(6):620-29.

- Garner DL, Dobrinsky JR, Welch GR, Johnson LA; Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* 1996; 45(6):1103-12.
- Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 1995; 53(2):276-84.
- Honeyfield DC, Krise WF. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana; *Advance in World Aquaculture 2000 Vol 7* p 49-58.
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 1984; 37:267-73.
- Labbé C, Maise G. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. *Aquaculture* 2001; 201(3-4):287-99.
- Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner, RA. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoa metabolism. *Aquaculture* 1998; 163:163-81.
- Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 2000; 41:241-50.
- Linhart O, Stech, L., Svarc J, Rodina M, Audebert JP, Grecu J, Billard R. The culture of the European catfish, *Silurus glanis* L. in Czech Republic and in France. *Aquat. Living Resour.* 2002; 15:139-44.
- Linhart O, Rodina M, Gela D, Kocour M, Rodriguez M; Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of eggs stickiness. *Aquat Living Resour.* 2003; 16(5) (*in press*).
- Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Heydorff, M., Maise, G., 1996. Flow cytometric analysis of plasma membrane damages of rainbow trout and turbot frozen spermatozoa. In: *Proceedings of Refrigeration and Aquaculture*, Bordeaux, France, March 1996, 65 - 72.
- Ogier de Baulny B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Maise G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology* 1997; 34:141-49.
- Riley KLP. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm for the production of red snapper and snapper hybrids. PhD Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2002; pp. 192
- Rodina M, Linhart O, Cosson J. Test of modification of KUROKURA solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench. In: Urban T. (Ed.), *Proc. Int. Scientific Conference XX. Genetic Days 2002*; Brno, Mendelian University of Agriculture and Forestry, 2002; 326-28.
- Segovia M, Jenkins, JA, Paniagua-Chavez C, Tiersch TR. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 2000; 53(7):1489-99.
- Songsasen N, Betteridge KJ, Leibo SP. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997; 56:143-52.
- Thomas CA, Garner DL, DeJarette JM, Marshall CE. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 1998; 58(3):786-93.
- Williot P, Kopeika EF, Goncharov BF. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture* 2000; 189:53-61.

**Adresy autorů:**

Ing. **Martin Flajšhans**, Ing. **Marek Rodina** a prof. Ing. **Otomar Linhart**, DrSc.: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, 389 01 Vodňany, [flajshans@vurh.jcu.cz](mailto:flajshans@vurh.jcu.cz)

Dr. **Jacky Cosson**: Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7009, Université Paris 6, Station Marine, 06230 Villefranche sur Mer, France