

ЛІПОПРОТЕЇНИ СПЕРМИ БУГАЯ ЗА ДОДАВАННЯ АНТИОКСИДАНТІВ У РОЗРІДЖУВАЧ

С. Й. Кава¹, І. М. Яремчук², Д. Д. Остапів²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини і біотехнологій ім. С. З. Гжицького
²Інститут біології тварин НААН України

Вивчали формування ліпопротеїнових комплексів у спермі бугая при розрідженні еякулятів середовищем з антиоксидантами. Встановлено, що еякуляти піддослідних бугаїв характеризуються об'ємом $4,3 \pm 0,18$ мл, концентрацією $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$ /мл спермій та їх рухливістю $7,4 \pm 0,16$ бали, містять білок-ліпідні комплекси, які представлені хіломікронами $26,9 \pm 1,93$ % та ліпопротеїнами різної щільності: дуже низької — $10,4 \pm 0,44$ %, низької — $18,3 \pm 1,84$ %, високої — $17,1 \pm 1,09$ % та дуже високої — $26,8 \pm 1,94$ %. Розрідження еякулятів лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем призводить до утворення макромолекул ліпопротеїнів з низькою електрофоретичною рухливістю. Відновлена форма глутатіону і аскорбінова кислота у складі розріджувача еякулятів сприяють формуванню ліпопротеїнових комплексів зі збільшенням розміру їх молекул і зниженням електрофоретичної рухливості та забезпечують захист від руйнування в процесі інкубування сперми.

Ключові слова: ЛІПОПРОТЕЇНИ, СЕРМА БУГАЯ, АНТИОКСИДАНТИ У РОЗРІДЖУВАЧ ЕЯКУЛЯТІВ

Виживання спермій, їх стійкість до факторів зовнішнього середовища і процесів технологічної підготовки до кріоконсервування та після розморожування значною мірою визначаються здатністю компонентів розріджувача взаємодіяти зі статевими клітинами і захищати їх внутрішньоклітинні структури й плазматичну мембрану. Відомо, що одним із компонентів розріджувачів є жовток курячого яйця, ліпіди якого здатні взаємодіяти з мембраною спермій й утворювати нові біокомплекси, які мають ліпопротеїнову природу і, проявляють стійкість навіть після розморожування та забезпечують захисний ефект при заморожуванні сперми [1–4]. Поряд з тим, на утворенні в процесі розрідження еякулятів ліпопротеїнові комплекси сперми бугаїв впливають температурні фактори. Доведено, що процеси технологічної обробки сперми стимулюють перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [5]. Зокрема, встановлено, що підготовка до заморожування й розморожування еякулятів призводять до значних фізико-хімічних пошкоджень мембран клітин при фазових переходах ліпідів, зростає ПОЛ протягом взаємодії з кріопротекторами і при заморожуванні [6]. Одночасно, з утворенням вторинних продуктів обміну речовин у процесі заморожування — розморожування сперми, утворюються тіобарбітуратактивні продукти ПОЛ, що призводить до руйнування ліпопротеїнових комплексів і пошкодження мембран. Є дані про те, що процес перекисного окиснення ліпідів супроводжується вибірковою зміною фосfolіпідних фракцій — лецитину, фосфатидилетаноламіну і кардіоліпіну, що послаблює гідрофобні зв'язки у мембранах і, в першу чергу, стійкість білково-ліпідних комплексів [7]. ПОЛ призводить до пошкоджень і морфологічних змін статевих клітин, порушень мітохондріальної активності [8], зменшення швидкості руху [6] і зниження життєздатності.

Для запобігання утворення високих рівнів продуктів ПОЛ при кріоконсервуванні та після розморожування сперми, забезпечення підвищення виживання статевих клітин та збереження функціональної активності мітохондрій, до середовищ додають сполуки з антиоксидантними властивостями, зокрема природні антиоксиданти [9–11]. Однак, якщо позитивний вплив природних антиоксидантів у складі розріджувачів еякулятів на якість спермій доведений, то невідомими залишаються формування і збереженість ліпопротеїнових

комплексів у розріджених еякулятах за додавання відновленої форми глутатіону та аскорбінової кислоти.

Мета роботи — вивчити дії відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти у розріджувачі на формування і стійкість ліпопротеїнових комплексів сперми бугаїв.

Матеріали і методи

Досліджували сперму бугаїв (21 гол.) у віці 3–10 років, які належать Львівському науково-виробничому центру «Західплемресурси». Сперму отримували на штучну вагіну з режимом використання бугаїв дуплетна садка два рази на тиждень. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), густиною під мікроскопом (у роздавненій краплі) і активністю (рухливістю) спермій (бали). У еякулятах визначали концентрацію спермій за допомогою фотоелектроколориметра (10^9 клітин/мл), вміст загального білка (мг/мл) [12], якісний і кількісний вміст фракцій ліпопротеїнів (ЛП; %) методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) з попереднім фарбуванням проб сперми розчином Судан III + Судан IV (1:1) у 70 % етиловому спирті. Для вивчення впливу антиоксидантів на вміст ліпопротеїнів еякуляти розріджували лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем (ЛЖГР) 1:10. У розріджувач додавали відновлену форму глутатіону (Г-SH) та аскорбінову кислоту (AA) в концентраціях 1,25, 2,5 та 5,0 мМ. Вміст ліпопротеїнів вивчали у спермі свіжоотриманій нерозрідженій, розрідженій та інкубованій протягом 24 год. за температури +2–4 °С. Статистичний аналіз отриманого цифрового матеріалу проведено за М. О. Плохінським (1969) [13].

Результати й обговорення

Еякуляти бугаїв характеризуються об'ємом $4,3 \pm 0,18$ мл, концентрацією спермій $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$ клітин /мл, вмістом загального білка — $7,3 \pm 0,25$ мг/мл та фракцій ЛП (відповідно до білків сироватки крові): хіломікронами (ХМ) — $26,9 \pm 1,93$ % та ЛП дуже низької — $10,4 \pm 0,44$ %, низької (β -ЛП) — $18,3 \pm 1,84$ %, високої (α -ЛП) — $17,1 \pm 1,09$ % та дуже високої — $26,8 \pm 1,94$ % щільності (рис. 1).

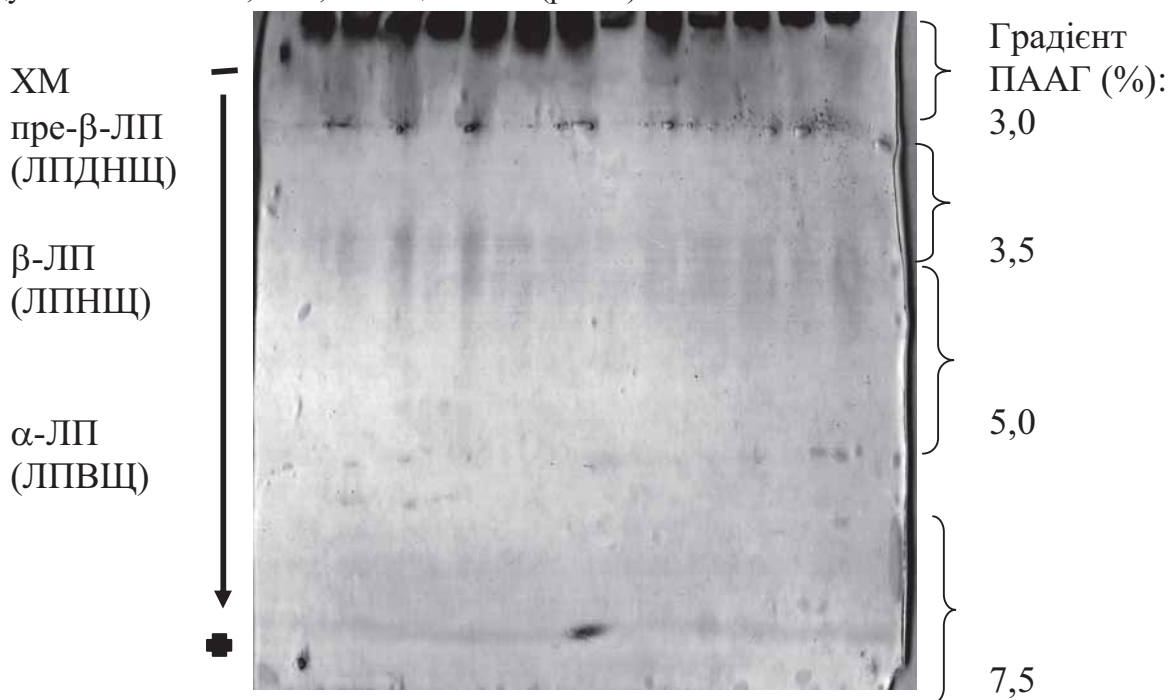


Рис. 1. Електрофореграма ліпопротеїнів сперми. Примітка: ХМ — хіломікрони; ліпопротеїни (ЛП): пре-β-ЛП (дуже низької щільності; ДНЩ); β-ЛП (низької щільності; НЩ); α-ЛП (високої щільності; ВЩ); ДВЩ (дуже високої щільності; зона фарби Судану III + IV); градієнт ПААГ (%): 3,0; 3,5; 5,0; 7,5 %

Вивченням впливу розріджувача на вміст ліпопротеїнів у спермі виявлено, що порівняно зі свіжоотриманою (рис. 1) кількість їх фракцій зменшується (рис. 2). Комплекси білків виявляються в зоні рухливості хіломікрон та ліпопротеїнів дуже низької щільності (рис. 2. А).

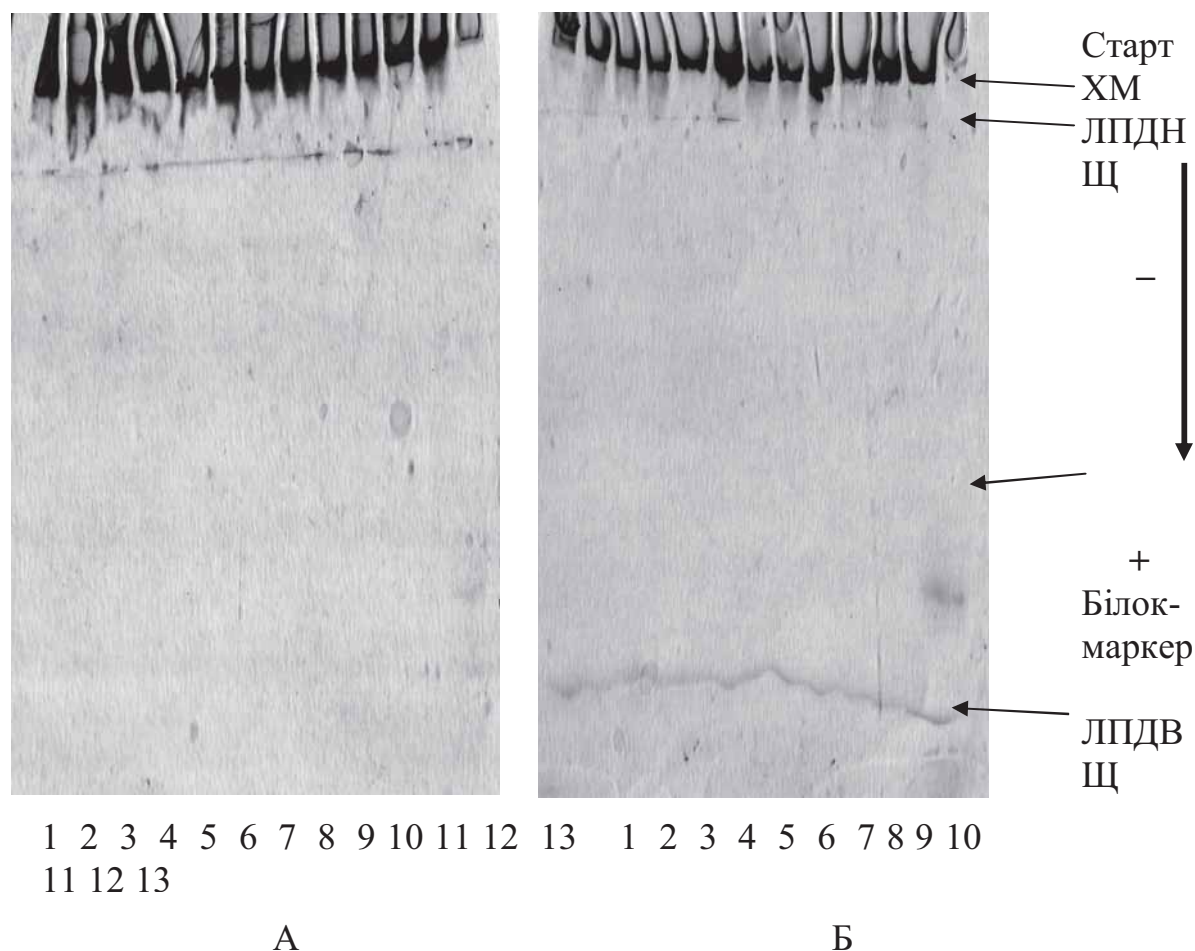


Рис. 2. Електрофореграми ліпопротеїнів сперми бугаїв після використання розріджувача еякулятів з антиоксидантами: А — після розрідження; Б — після розрідження і зберігання 24 год. при температурі +2–+4 °С. Проби сперми з Г-SH (мМ): № 1 — 5,0; № 2 — 2,50; № 3 — 1,25; АА (мМ): № 4 — 5,0; № 5 — 2,50; № 6 — 1,25; № 8 — контроль; № 13 — білок-маркер.

При цьому, внаслідок взаємодії ліпідів жовтка з білками сперми і утворення макромолекул з низькою електрофоретичною рухливістю вміст хіломікрон становить $47,1 \pm 4,90$ %, а ЛП дуже низької щільності — $50,8 \pm 4,75$ %, що вище, порівняно з нерозбавленою спермою, відповідно, на 17,5 та 40,4 %.

Інкубування (зберігання) сперми призводить до руйнування утворених ЛП комплексів — знижується вміст хіломікрон на 19,8 % ($p < 0,05$), ЛП дуже низької щільності — майже не змінюється та виявляються ЛП дуже високої щільності ($15,3 \pm 2,40$ %), порівняно зі свіжоотриманою розбавленою спермою.

Додавання до розріджувача Г-SH в концентрації 1,25 та 2,5 мМ підвищує вміст хіломікрон на 19,0 % ($p < 0,05$), а 5,0 мМ — на 23,3 % ($p < 0,01$) та знижує, відповідно, на 17,0 % ($p < 0,05$) та 21,2 % ($p < 0,01$) ЛП дуже низької щільності, порівняно до контролю (рис. 3).

Після 24 год інкубування — вміст хіломікрон вищий на 16,5–24,4 % ($p < 0,01$), а ЛП дуже низької щільності, навпаки, нижчий на 12,4–17,7%, порівняно до контролю. При цьому, з'являється фракція ЛП дуже високої щільності (ДВЩ), вміст якої у дослідних пробах нижчий, ніж у контрольних на 6,9, 1,2 та 4,0 %, відповідно, при 1,25, 2,5 та 5,0 мМ Г-SH.

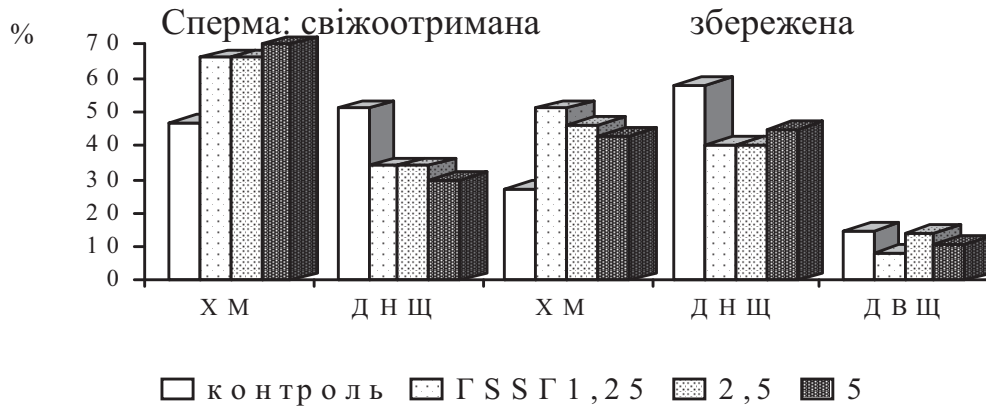


Рис. 3. Вміст фракцій ліпопротеїнів за дії відновленої форми глутатіону, (n=5)

Аналогічні результати отримані при додаванні у розріджувач сперми АА: 1,25 мМ — підвищує на 11,6 % ($p<0,05$), 2,5 мМ — на 19,3 % ($p<0,05$) та 5,0 мМ — на 30,6 % ($p<0,01$) вміст хіломікрон, порівняно до контролю (рис. 4).

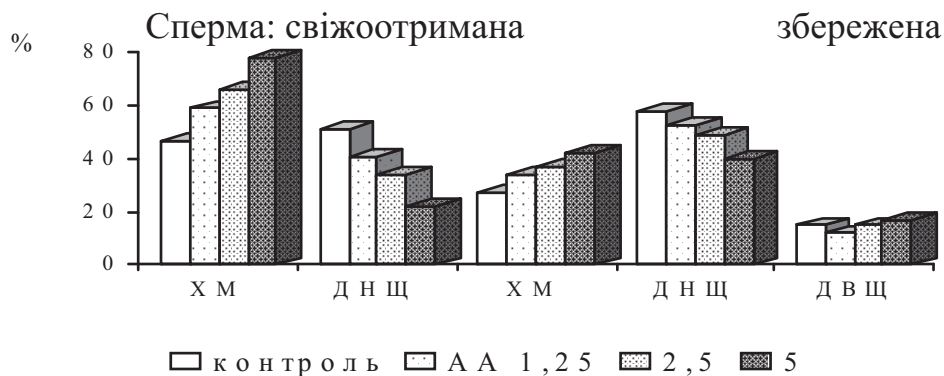


Рис. 4. Вміст фракцій ліпопротеїнів за дії аскорбінової кислоти, (n=5)

Однак, вміст ЛП дуже низької щільності знижується на 9,5 % при — 1,25 мМ, на 17,2 % — 2,50 мМ та на 28,0 % ($p<0,01$) за 5,0 мМ АА, порівняно з контролем.

Після інкубування розрідженої сперми з АА у дозах 1,25, 2,5 і 5,0 мМ вміст хіломікрон вищий, відповідно, на 7,5, 10,2 і 15,3 %, а ЛП дуже низької щільності менший, відповідно, на 4,1, 8,5 та 17,6 %, порівняно до контролю. При цьому, вміст ЛП дуже високої щільності нижчий на 2,2 % при 1,25 мМ вказаного антиоксиданта, а при 2,5 мМ він майже однаковий ($14,1\pm 1,01$ %) і вищий на 2,4 % при 5,0 мМ, порівняно з контролем.

Висновки

Еякуляти підослідних бугаїв характеризуються об'ємом $4,3\pm 0,18$ мл, концентрацією $1,09\pm 0,11 \times 10^9$ /мл сперміїв та їх рухливістю $7,4\pm 0,16$ бали, містять білок-ліпідні комплекси, які представлені хіломікронами $26,9\pm 1,93$ % та ліпопротеїнами різної щільності: дуже низької — $10,4\pm 0,44$ %, низької — $18,3\pm 1,84$ %, високої — $17,1\pm 1,09$ % та дуже високої — $26,8\pm 1,94$ %. Розрідження еякулятів лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем призводить до утворення макромолекул ліпопротеїнів з низькою електрофоретичною

рухливістю. Відновлена форма глутатіону і аскорбінова кислота у складі розріджувача еякулятів сприяють формуванню ліпопротеїнових комплексів зі збільшенням їх розміру і зниженням електрофоретичної рухливості та забезпечують захист від руйнування в процесі інкубування сперми.

Перспективи подальших досліджень. У подальших дослідженнях буде продовжено вивчення особливостей формування ліпопротеїнових комплексів у спермі бугаїв.

S. Yo. Kava, I. M. Yaremchuk, D. D. Ostapiv

LIPOPROTEINS BOVINE SPERM UNDER ADDING ANTIOXIDANTS IN EXTENDER ADDITION

S u m m a r y

The formation of complex lipoproteins in sperm bulls under antioxidants extender addition was studied. Established that the experimental bulls characterized ejaculate volume $4,3 \pm 0,18$ ml concentration, $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$ / ml spermatozoa and their mobility $7,4 \pm 0,16$ points, containing protein-lipid complexes represented hilomikrons $26,9 \pm 1,93$ % and varying density lipoproteins: very low — $10,4 \pm 0,44$ %, low — $18,3 \pm 1,84$ %, high — $17,1 \pm 1,09$ % and very high — $26,8 \pm 1,94$ %. Dilution of ejaculates with lactoses-egg yolk-glycerin extender leads to the formation of macromolecules lipoprotein with low of electrophoresis mobility. Reduced form of glutathione and ascorbic acid in composition of ejaculate extender promote the formation of lipoprotein complexes with increasing size of their molecules and a lowers of electrophoresis mobility and provide protection from damage in sperm incubation processes.

С. Й. Кава, И. М. Яремчук, Д. Д. Остапів

ЛИПОПРОТЕИНЫ СПЕРМЫ БЫКА ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТОВ В РАЗАВИТЕЛЬ

А н н о т а ц и я

Изучали формирование липопротеиновых комплексов в сперме быка при разбавлении эякулятов средой с антиоксидантами. Установлено, что эякуляты подопытных быков характеризуются объёмом $4,3 \pm 0,18$ мл, концентрацией $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$ /мл спермиев и их подвижностью $7,4 \pm 0,16$ балла, содержат белок-липидные комплексы, которые представлены хиломикронами $26,9 \pm 1,93$ % и липопротеинами разной плотности: очень низкой — $10,4 \pm 0,44$ %, низкой — $18,3 \pm 1,84$ %, высокой — $17,1 \pm 1,09$ % и очень высокой — $26,8 \pm 1,94$ %. Разбавление эякулятов лактозо-желточно-глицериновым разбавителем приводит к образованию макромолекул липопротеинов с низкой электрофоретической подвижностью. Восстановленная форма глутатиона и аскорбиновая кислота в составе разбавителя эякулятов способствуют формированию липопротеиновых комплексов с увеличением их размера и снижением электрофоретической подвижности и обеспечивают защиту от разрушения в процессе инкубирования спермы.

1. *Foulkes J. A.* The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa / J. A. Foulkes // J. Reprod. Fertil. — 1977. — V. 49. — P. 277–284.

2. *Watson P. F.* The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein / P. F. Watson // J. Reprod. Fertil. — 1981. — V. 62. — P. 483–492.

3. *MacDonald B. J.* A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein / B. J. MacDonald, J. A. Foulkes // *J. Reprod. Fertil.* — 1981. — V. 63. — P. 407–414.
4. *Cookson A. D.* Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa / A. D. Cookson, A. N. Thomas, J. A. Foulkes // *J. Reprod. Fertil.* — 1984. — V. 70. — P. 599–604.
5. *Наук В. А.* Особенности перекисного окисления липидов при замораживании спермы быков и хряков-производителей / В. А.Наук, А. М. Гуськов // *Докл. ВАСХНИЛ.* — 1983. — № 2.— С. 27–29.
6. *Mossad H.* Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men – implication for artificial insemination / H. Mossad, M. Morshedi, J. P. Torner, S. Oehninger // *Archives of Andrology.* — 1994. — V. 33. — P. 51–57.
7. *Курбатов А. Д.* Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных / А. Д. Курбатов, Е. М. Платов, Н. В. Корбан [и др.]. — Л. : Агропромиздат, 1988. — 256 с.
8. *O’Connell M.* The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function / M. O’Connell, N. McClure, S. E. M Lewis // *Human Reproduction.* — 2002. — V. 17. — P. 704–709.
9. *Slaweta R.* The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen sperm / R. Slaweta, T. Liaskowska // *Anim. Reprod. Sci.* — 1987. — V. 13, № 4. — P. 249–253.
10. *Donnelly E. T.* The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa / E. T. Donnelly, N. McClure, S. E. M. Lewis // *Mutagenesis.* — 1999. — V. 14. — P. 505–512.
11. *Шаран М. М.* Підвищення ефективності штучного осіменіння корів і телиць. / М. М. Шаран. — Львів, 2009. — 38 с.
12. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. S. Randall // *J Biol Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265–271.
13. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников. / Н. А. Плохинский. — М. : Колос, 1969. — 255 с.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.