

УДК: 591.133.2:612.616:636.4:591.133.13

Корбецький А.Р.²*Інститут біології тварин НААН***КІНЕМАТИЧНІ ПОКАЗНИКИ СПЕРМІЙВ ТА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ЇХ
АКРОСОМ ЗА ДОДАВАННЯ СІМ'ЯНОЇ ПЛАЗМИ ДО
ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ ПСІВ**

У статті наведено результати дослідження впливу плазми сперми доданої до деконсервованої сперми псів на активність спермійв, виживаність, кінематичні показники та збереженість акросом спермійв. За відсотком рухливих спермійв та спермійв з прямолінійним поступальним рухом не встановлено вірогідних різниць між різними розбавниками по цих показниках. окремі кінематичні показники спермійв вірогідно відрізнялися при використанні різних розбавників, а саме: загальна рухливість ($p < 0,05$), VSL, VCL, ALH, STR i LIN ($p < 0,01$). Спермії, розбавлені з ПР мали нижчі показники VCL (1 і 3 год), ALH (0, 1 і 3 год) і кількість спермійв з прямолінійним рухом (0, 1 і 3 год) у порівнянні із зразками, які розбавлені з Tris-середовищем у процесі інкубації, вказуючи на нижчий рівень спермійв з гіперактивним рухом. Середовище для деконсервації не впливало на ступінь ушкодження акросом - при використанні як простатної рідини і тріс-буфера для розбавлення показали приблизно однакові результати.

Кріоконсервація спермійв є важливим інструментом для забезпечення генетичної різноманітності і для біотехнології відтворення різних видів тварин. Однак, стан кріоконсервації сперми собак є все ще неоднозначним або нездовільним. Рівень результативних осіменінь є надзвичайно варіабельним і загалом є низьким, ніж при осімененні свіжою спермою [1]. Існує багато факторів, які впливають на функціональне виживання замороженої сперми собак. Ускладнює вдосконалення методів заморожування те, що спермії від різних особин можуть показувати різну стійкість до заморожування при використанні однакових протоколів [2, 3].

Простата є єдиною допоміжною статевою залозою уrogenітального тракту собак і простатна рідина є практично єдиним компонентом сім'яної плазми. Секрет простати в собак містить дуже низький рівень фруктози [3, 4], також містить низьку концентрацію кислої фосфатази, в 10 раз меншу концентрацію, ніж в людській сім'яній плазмі і дуже високий рівень аргінінестерази [5]. Біологічна функція цих складників потребує подальшого дослідження [6].

Різні дослідження демонструють негативний вплив секрету простати на спермії інкубовані *in vitro*: розбавлення сперми собак з сім'яною плазмою (СП) спричиняє зниження рухливості і кількість морфологічно нормальних спермійв після 2 год

² Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук М. М. Шаран
Корбецький А.Р. 2013

інкубації при 37 °C [7]. Секрет простати також чинить шкідливий вплив на збереженість спермій, як після охолодження до 4 °C [6] так і при кріоконсервації [7]. Інші експерименти показали, що контакт плазми сперми з епідидимальними сперміями перед заморожуванням покращив запліднюваність після внутрішньоматкового осіменіння [8], також використання СП для розбавлення вітталої сперми собак призвело до вищої запліднюваності після інтравагінальних осіменінь [9,10].

Капацитація і акросомна реакція, що відбувається в жіночому статевому тракті проходять незадовго до запліднення яйцеклітини, і якщо воно не відбувається, спермій швидко гинуть. Однією із функцій СП собак є здатність вкривати своїми білками мембрани спермій тим самим маскуючи рецептори прогестерону і затримуючи капацитацію [13]. Оскільки, процес заморожування-відтавання спричиняє дестабілізацію мембран спермій, яка є схожою до капацитації [14], вважається, що присутність СП пригнічує чи навіть відвертає капацитацію спермій, продовжуючи виживання спермій.

Тому, метою наших досліджень було вивчення впливу секрету простати при додаванні до розмороженої сперми псів та інкубації з нею на активність, цілісність цитоплазматичних мембран та акросом спермій.

Матеріали і методи.

Для досліджень використовували дев'ять клінічно здорових статевозрілих псів віком 2-5 р, різних порід та живою масою, а саме: тварини змішаної породи (n=2), що утримувались у вольєрі при Інституті біології тварин НААН (м.Львів) та тварини, що приватно утримувались власниками і були систематично залучені у дослідження, порід - доберман пінчер (n=1), англійський бульдог (n=3), німецька вівчарка (n=2), кавказька вівчарка (n=1).

Всі маніпуляції з тваринами проводились в дослідній клініці Лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН (м.Львів). Сперму від піддослідних псів відбирали не частіше, ніж раз на тиждень і не рідше ніж раз на два тижні. Перед взяттям сперми препуціальний отвір очищався ватними дисками змоченими фізіологічним розчином від залишків сечі та інших видимих забруднень. Відбір сперми проводився мануально, як було описано [12], в ПВХ рукавиці, методом мастурбації в попередньо підігріті до температури 37 °C стерильні лійки та градуйовані пластикові пробірки об'ємом 15 мл. Для більшості досліджень використовували тільки другу фракцію еякуляту, третю, простатну фракцію, використовували для вивчення впливу секрету простати на якість спермій собак при інкубації з нею після деконсервації. Після взяття сперма поміщалась у водяний термостат (37 °C) до оцінки якості і подальших технологічних процедур.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), активністю (%) та концентрацією спермій. Для заморожування допускалися еякуляти з концентрацією не менше 100 млн/мл, активністю не менше 70 % і з кількістю патологічних форм не більше 15 %. Заморожування сперми здійснювали в соломинках 0,5 мл (IMV, Франція) на програмному заморожувачі Planer R 204 (Великобританія). Після закінчення програми заморожування, соломинки

переносили у рідкий азот (-196 °C). Деконсервацію сперміїв проводили у водяній бані при 70 °C впродовж 8 с.

Комп'ютерний аналіз руху сперміїв проводився в НВЦ “Західплемресурси” на сисиемі Sperm Vision (Minitube, Німеччина). Результат знімався з мікроскопа Olympus (Японія) методом позитивного фазового контраstu, при збільшенні × 200. Пять полів зору випадково обиралися та підрахувалось середнє. Швидкість камери налаштовувалась на 20 кадрів в секунду. Обєкти, розміщені в камері, розпізнавались як спермії за розмірами і яскравістю.

Цілісність акросом сперміїв визначали при допомозі маркерного фермента акрозину, який знаходиться в неушкоджений акросомі [1]. При порушенні цілісності акросомальної мембрани акрозин разом з іншим вмістим акросом виходить в оточуюче спермії середовище. Зростання активності акрозину в середовищі прямоопропорційне ступеню ушкодження акросом. Збереженість акросом (ЗА) вираховували за формулою:

$$\text{ЗА\%} = 100\% \times (\text{макс_акро} - \text{досл_акро}) / \text{макс_акро}$$

де:

макс_акро – активність акрозину в середовищі при примусовому ушкодженні акросом в суспензії свіжоотриманих сперміїв з концентрацією 100 × 10⁶ сперміїв/мл при допомозі Triton X-100, і вважалось що ушкодилося 100% акросом;

досл_акро – активність акрозину в дослідному зразку.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм Statistica 8 (StatSoft, США).

Результати та обговорення.

Статистичним аналізом не виявлено вірогідних різниць між різними розбавниками за показниками рухливості сперміїв (табл.1).

Таблиця 1

Відсоток рухливих сперміїв та спермії з ППР (%), після розмороження та інкубації з Tris буфером або сім'яною плазмою (n=9, M±m)

	Загальна рухливість (%)	Спермії з ППР (%)
0 год		
ПР	54,7±4,3 ^a	39,8±4,3
Tris	48,6±3,2 ^b	36,4±1,4
1 год		
ПР	36,9±3,9	34,5±1,6
Tris	39,1±3,0	33,8±1,2
2 год		
ПР	33,6±3,5	32,8±1,2
Tris	37,2±3,9	33,3±1,2
3 год		
ПР	28,1±2,5	31,4±0,6
Tris	31,9±3,0	32,2±0,9
4 год		
ПР	4,5±1,1	30,1±0,1
Tris	30,8±3,7	31,6±0,8

Сім'яна плазма не продовжує виживання спермів після розморожування. Рухливість спермів знизилась до менш, ніж 5 % впродовж 4 год інкубування після розморожування в зразках розбавлених з сім'яною плазмою.

Деякі з показників отриманих з допомогою Sperm Vision (табл. 2) вірогідно відрізнялися при використанні різних розбавників, а саме: загальна рухливість ($P < 0,05$), VSL, VCL, ALH, STR і LIN ($P < 0,01$). Більше того, індивідуальні різниці завжди були статистично вірогідними ($P < 0,01$).

Таблиця 2

Кінематичні показники спермів після розмороження та інкубації з Tris буфером або сім'яною плазмою (n=9, M±m)

	VAP (мм/с)	VSL (мм/с)	VCL (мм/с)	ALH (мм)	BCF (Гц)	STR (%)	LIN (%)
0 год							
ПР	84,2±4,2	77,9±3,9*	114,0±4,9	4,6±0,1*	25,3±1,2	90,8±0,4	67,5±1,2*
Tris	77,7±5,0	70,8±5,0**	111,5±5,3	5,1±0,2**	25,7±1,3	85,1±5,0	63,4±2,0**
1 год							
ПР	82,2±5,1	75,7±4,9**	115,4±5,6*	5,0±0,2**	26,3±1,0	91,0±0,7*	65,8±2,2*
Tris	74,4±4,8	63,7±4,7**	125,3±7,1*	6,5±0,4*	24,1±1,2	85,0±1,6**	54,1±2,8**
2 год							
ПР	85,2±5,0	77,4±5,1	120,1±8,2	5,5±0,4	20,1±1,9	88,7±1,4**	65,9±3,3
Tris	74,7±5,0	72,3±4,7	127,4±6,0	6,3±0,4	22,5±2,5	83,3±1,7*	51,3±3,1
3 год							
ПР	72,2±6,8	64,1±6,8	108,2±7,2**	6,3±0,5**	20,4±1,9	87,6±1,1	60,2±3,4**
Tris	75,9±5,3	64,2±5,0	130,6±7,5*	7,2±0,4*	20,8±2,5	83,9±1,1	50,7±2,6**

Примітка * - вірогідна різниця при $p < 0,05$, ** - вірогідно при $p < 0,01$,

Розглядаючи індивідуальні часові відрізки, загальна рухливість зразків розбавлених із простатною фракцією була вищою одразу після розбавлення ($p < 0,05$). Інші параметри рухливості отримані за допомогою комп'ютерного аналізатора показали різні залежності між розбавленням простатною фракцією і Tris-середовищем: VSL було вірогідно вищим у зразку сперми розбавленої простатною фракцією при розморожуванні і після 1 год інкубації ($p < 0,05$). Також, STR і LIN були вищі в зразках, розбавлених СП на 1 і 2 год та на 0, 1 і 3 год, відповідно. У свою чергу, VCL і ALH були вірогідно вищі в зразках розбавлених Tris середовищем на 1 і 3 год ($P < 0,01$) і на 0-1 год ($P < 0,01$) і на 3 год ($P < 0,05$), відповідно.

Спермії, розбавлені з ПР мали нижчий VCL (1 і 3 год), ALH (0, 1 і 3 год) і вищу кількість спермів з прямолінійним рухом (0, 1 і 3 год) у порівнянні із зразками, які розбавлені з Tris-середовищем у процесі інкубації, вказуючи на нижчий рівень спермів з гіперактивним рухом [12]. Причиною цього може бути те, що СП заблоковує чи відвертає зміни в плазматичних мембрanaх схожих на капацитацію, спричинених різкими температурними перепадами, що виникають в процесі кріоконсервації [13], але це може бути можливим тільки в тому випадку, якщо в спермі ще не відбулось акросомної реакції [14], ця гіпотеза заперечить нашим дослідженням.

Загальна рухливість і VSL буливищі в зразках розбавлених простатичною рідиною після розмороження (0 і 1 год, вірогідно) і знизилось до рівня зразків сперміїв розбавлених з Tris-середовищем. Ці результати частково не узгоджуються з результатами отриманими попередніми дослідженнями деяких авторів [10], де не спостерігалось різниці між зразками розбавленими з СП, фізичним розчином чи середовищем TALP без альбуміну аж до 210 хв інкубації після розморожування.

Додавання СП до сперми собак вірогідно вплинуло на окремі параметри якості сперми після розморожування, хоча і не мало впливу на виживаність сперми і цілісність акросомальних мембрани (рис 1). [12] показали схожі результати, але припустили, що сім'яна плазма може термінувати акросомні реакції. Однак у наших дослідженнях середовище для деконсервації не впливало на ступінь ушкодження акросом і при використанні простатної рідини і тріс-буфера для розбавлення отримано однаковий результат.

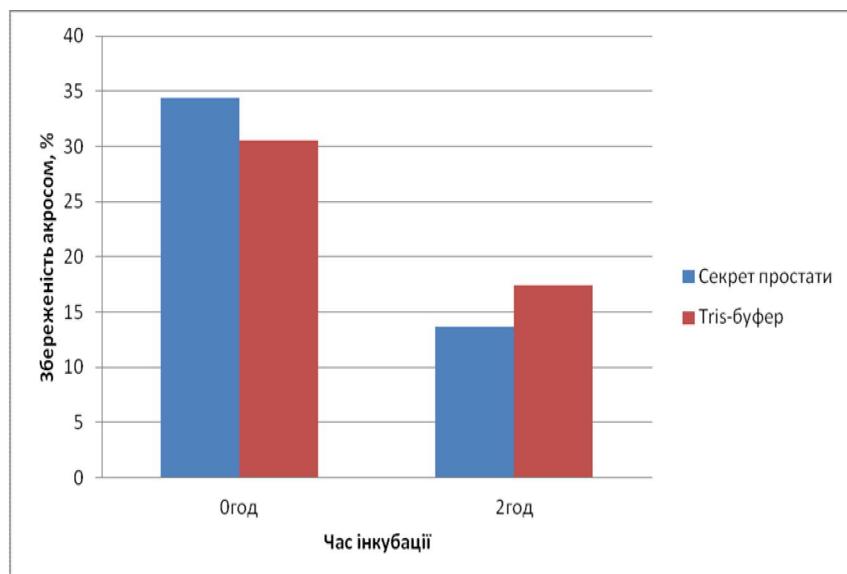


Рис 1. Збереженість акросом сперміїв інкубованих з Tris-буфером чи сім'яною плазмою протягом 2 годин (M±m)

Висновки.

За відсотком рухливих сперміїв та сперміїв з прямолінійним поступальним рухом не встановлено ніяких вірогідних різниць між різними розбавниками. Сім'яна плазма не продовжує виживаність сперміїв після розморожування. Спермії, розбавлені з ПР мали нижчі VCL (1 і 3 год), ALH (0, 1 і 3 год) і більшу кількість сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом (0, 1 і 3 год) у порівнянні із зразками, які розбавлені з Tris-середовищем у процесі інкубації, вказуючи на нижчий рівень сперміїв з гіперактивним рухом. Середовище для деконсервації не впливало на ступінь ушкодження акросом при

використанні простатної рідини і тріс-буферу для розбавлення отримано приблизно однакові результати.

Література

1. Ескин Г. В. Теория и практика искусственного осеменения свиней свежевзятой и замороженной спермой / Г. В. Ескин., А. Г. Нарижный., Г. С. Походня // Монография. - Белгород : Везелица, —2007. —253 с.
2. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев, —1991. —198с.
3. Антонюк В. Биохимический контроль за качеством спермы / В. Антонюк // Доклады ВАСХНИЛ. —1980. —№ 1. —С. 27-30.
4. Курбатов А. Д. Криоконсервация спермиев сельскохозяйственных животных / А.Д.Курбатов., Е.В.Платов., Н.В.Корбан., Л.Г.Мороз., В.А. Наук. и др. // Л.: Агропромиздат Ленингр. отд-ние, —1988. — 256с.
5. Nöhlning JO, Shuttleworth R, de Haas K, Thompson PN. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. Theriogenology 2005;64:975– 91.
6. Doak RL, Hall A, Dale HE. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. J Reprod Fertil 1967;13: 51–8.
7. Ellington JE, Meyers-Wallen VN, Ball BA. Establishment of a coculture system for canine sperm and uterine tube epithelial cells. Vet Rec 1995;136:543–4.
8. Eilts BE. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology 2005;64:685–91.
9. Troedsson MHT, Desvouges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. Anim Reprod Sci 2005;89:171–86.
10. Strzemienski PJ. Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa. J Reprod Fertil 1989;87:519– 28.
11. Rozeboom KJ, Rocha-Chavez G, Troedsson MHT. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. Reproduction 2001;121:567–72.
12. Linde-Forsberg C. Hints on dog semen freezing, cryoextenders, and frozen semen artificial insemination. In: Proceedings from the society for theriogenology meeting. Colorado, Springs; August 2002. p. 303–20.
13. Seager SJ, Fletcher WS. Collection, storage, and insemination of canine semen. Lab Anim Sci 1972;22:177–82.
14. England GCW, Burgess CM, Freeman SL, Smith SC, Pacey AA. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. Theriogenology 2006;66:1410–8.

Summary

A. R. Korbetsyy

**EFFECT OF SEMINAL PLASMA ADDITION AFTER DOG SEMEN
THAWING ON THE KINEMATIC INDEXES AND INTACTNESS OF
SPERM ACROSOME**

In this article are given the study results of impact of plasma added to thawed dog semen on the sperm motility, progressive activity, kinematic parameters and sperm acrosome intactness. The percentage of motile spermatozoa and spermatozoa with a straight forward movement did not show any significant difference between diluents by these terms. The motility decreased to less than 5 % within 4 h of incubation after thawing in samples diluted with seminal plasma. Some of the parameters obtained using Sperm Vision differed significantly when using different diluents, such as: total motility ($P < 0,05$), VSL, VCL, ALH, STR and LIN ($P < 0,01$). Moreover, individual differences were always statistically significant ($P < 0,01$). Spermatozoa diluted with seminal plasma had lower VCL (1 and 3 h), ALH (0, 1, and 3 h) and a higher number of sperm with a straight motion (0, 1, and 3 h) compared with samples that are diluted with Tris-buffer during incubation, indicating a lower sperm hyperactive movement. According to our research thawing has no effect on the extent of damage and the acrosome when used as prostatic fluid and tris-buffer for dilution showed approximately the same results.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Федорович Є.І.