Влияние криоконсервации спермы на структуру ядра и хроматина сперматозоидов жеребцов

Influence of cryopreservation of sperm on structure of a nucleus and chromatin of stallion' spermatozoa

Атрощенко М.М.
Рязанская обл.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-8
УДК 636.1.082.453

Ключевые слова: жеребцы, сперма, криоконсервация, электронная микроскопия.

Key words: stallions, sperm, cryopreservation, electron microscopy.

Резюме. Эффективность искусственного осеменения кобыл зависит от многих факторов, в том числе от качества криоконсервированной спермы жеребцов. При криоконсервации спермы отмечаются значительные повреждения органоидов половых клеток: акросом, клеточных мембран,

митохондрий. Одним из методов, используемых, для оценки структурной целостности сперматозоидов является электронная микроскопия. Электронно-микроскопическое исследование позволяет провести качественную и количественную оценку состояния клеточных органелл, необходимых для выполнения сперматозоидами оплодотворяющей функции, и, в ряде случаев, выявить причину их функциональных нарушений. С помощью методов световой и электронной микроскопии была проведена оценка качества и криоустойчивости спермы, структурной целостности ядра и хроматина сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме у 35 жеребцов. Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением после криоконсервации спермы уменьшилось в среднем с 42,7 до 17,7% ($p < 0,001$). Выживаемость сперматозоидов при температуре 2–4 °С также снизилась, с 117,0 до 48,5 часов ($p < 0,001$). Проведение электронно-микроскопического исследования позволило определить основные изменения в структуре ядра сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме. При криоконсервации спермы по технологии ВНИИ коневодства количество сперматозоидов с аномальной формой ядра увеличивается в среднем на 2,4%, с 5,3 до 7,7%. Численность сперматозоидов с вакуолизацией хроматина после замораживания-оттаивания спермы повышается в среднем на 1,5% ($p < 0,05$), с 1,2 до 2,7%. По результатам проведённых исследований можно отметить, что патологии ядра и хроматина сперматозоидов у жеребцов минимальные, как в нативной, так и в криоконсервированной сперме.

Summary. The efficiency of artificial insemination of mares depends on many factors, including quality of cryoconserved sperm of stallions. At cryopreservation of sperm considerable damages of organelles of gametes are noted: acrosome, cellular membranes and mitochondria. Electronic microscopy is one of the methods used for assessment of structural integrity of spermatozoa. The electronic and microscopic research allows

Авторы / Authors

¹Атрощенко М.М., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии размножения, e-mail: atomiks-77@mail.ru

²Брагина Е.Е., доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии, e-mail: bragor@mail.ru

¹Зайцев А.М., кандидат сельскохозяйственных наук, директор, e-mail: amzaitceff@mail.ru

¹Калашников В.В., доктор сельскохозяйственных наук, академик РАН, научный руководитель

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, e-mail: vniik08@mail.ru

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова

Atroshchenko M.M., Bragina Ye. Ye., A.N. Belozersky Zaitsev A.M., Kalaschnikov V.V.

to carry out quality and quantitative evaluation of a condition of the cellular organelles necessary for spermatozoa to fertilize and in some cases to establish the reason of their functional disorder. Quality and cryostability of sperm, structural integrity of a nucleus and chromatin of spermatozoa in native and cryopreserved sperm of 35 stallions was assessed by means of methods of light and electronic microscopy. The number of spermatozoa with progressive motility after a cryopreservation of sperm has decreased on average from 42,7 to 17,7% ($p < 0,001$). The survival of spermatozoa at a temperature 2–4 °C has also decreased from 117,0 to 48,5 hours ($p < 0,001$). Carrying out an electronic and microscopic research of native and cryopreserved sperm of stallions has allowed defining the main changes in structure of a nucleus of spermatozoa in native and cryopreserved sperm. Sperm cryopreservation by the technology of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding the quantity of spermatozoa with an abnormal form of a nucleus increases on average by 2,4%, from 5,3 to 7,7%. The number of spermatozoa with a chromatin vacuolization after freezing thawing of sperm increases on average by 1,5% ($p < 0,05$), from 1,2 to 2,7%. The results of the carried out researches show that pathologies of a nucleus and chromatin of stallions' spermatozoa are minimal, both in native, and in cryopreserved sperm.

Введение

Эффективность искусственного осеменения зависит от многих факторов, в том числе от качества криоконсервированной спермы. При замораживании спермы происходят значительные повреждения органоидов половых клеток: акросом [1], [2], клеточных мембран [7], митохондрий [3], [6]. Основным методом для изучения подвижности, морфологического состава и выживаемости сперматозоидов является световая микроскопия. Но для оценки состояния большинства клеточных органоидов сперматозоидов этот метод не подходит.

С использованием метода электронной микроскопии установлено, что наибольшему негативному воздействию на всех этапах работы со спермой подвергаются головки сперматозоидов, и в частности акросомы [4]. Снижению фертильности спермы также способствуют нарушения структуры хроматина сперматозоидов [5]. Изучение влияния криоконсервации на структурную целостность половых клеток позволяет объективно оценить криопотери от повреждения различных органоидов сперматозоидов при замораживании спермы жеребцов.

Целью данной работы стало изучение с помощью метода электронной микроскопии целостности ядра и хроматина сперматозоидов у жеребцов, и оценка повреждений этих органоидов при криоконсервации спермы.

Материалы и методы исследований

В опытах использовали 35 жеребцов верховых и рысистых пород, в возрасте от 4 до 22 лет. Сперму, предназначенную для исследований, получали согласно "Рекомендациям по взятию, разбавлению и замораживанию спермы жеребцов" (2006). Образцы нативной и криоконсервированной спермы разводили изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:10, добавляли фиксатор – 2,5 % раствор глутарового альдегида, приготовленный на 0,1 М каоди-

латном буфере (pH 7,2), центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, осадок фиксировали тем же фиксатором, дофиксировали 1 % раствором осмиевой кислоты и заливали в эпон. Ультратонкие срезы получали на микротоме UltraCut III, докрашивали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Hitachi 700. Хроматин ядра сперматозоидов изучали при увеличении $\times 16000$ – 18000 .

Статистическую обработку осуществляли с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0. Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики и выражали в виде среднеарифметической (M) и её стандартной ошибки (m).

Результаты исследований. Количество сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением (ППД) после криоконсервации спермы уменьшилось, с 42,7 до 17,7% ($p < 0,001$) (табл. 1). Выживаемость сперматозоидов при температуре 2–4 °C также снизилась, с 117,0 до 48,5 часов ($p < 0,001$).

В нативной сперме нормальная форма ядра установлена у 94,7% сперматозоидов, после криоконсервации этот показатель снижается на 2,4% и составляет 92,3%. По результатам исследования можно отметить, что при замораживании-оттаивании спермы форма ядра у сперматозоидов практически не изменяется. Недостаточно конденсированный или незрелый хроматин был установлен у 8 (22,9%) жеребцов, и встречался в интервале от 1,0 до 7,8% сперматозоидов. Численность сперматозоидов с разрушенным хроматином при замораживании-оттаивании увеличивается незначительно, в среднем на 0,6%. При криоконсервации отмечено небольшое увеличение количества сперматозоидов с вакуолями хроматина, в среднем на 1,5% ($p < 0,05$).

Проведение электронно-микроскопического исследования позволило определить основные изменения в структуре ядра сперматозоидов жеребцов в нативной и криоконсервированной сперме.

Заключение

Патологии ядра и хроматина сперматозоидов у жеребцов минимальные, как в нативной, так и в криоконсервированной сперме. Основными патологиями ядра и хроматина сперматозоидов у жеребцов являются вакуолизация хроматина и изменение формы ядра. При криоконсервации спермы жеребцов количество сперматозоидов с аномальной формой ядра увеличивается в среднем на 2,4%, с вакуолизацией хроматина на 1,5%.

Литература

1. Айбазов, М.М. Влияние технологии замораживания на биологическую полноценность спермы баранов / М.М. Айбазов, П.В. Аксенова, И.Г. Сердюков // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2013. - № 4. - С. 9-10.
2. Атрощенко, М.М. Влияние криоконсервации спермы жеребцов на целостность структуры сперматозоидов / М.М. Атрощенко, Е.Е. Брагина // Коневодство и конный спорт. - 2009. - № 3. - С. 11-12.
3. Атрощенко, М.М. Влияние криоконсервации на морфологические и ультраструктурные показатели спермы жеребцов / М.М. Атрощенко, Е.Е. Брагина // Коневодство и конный спорт. - 2011. - № 1. - С. 21-23.
4. Атрощенко, М.М. Сравнительное изучение ультраструктуры сперматозоидов в эпидидимальной, эякулированной и криоконсервированной сперме жеребцов / М.М. Атрощенко, В.В. Калашников, Е.Е. Брагина, А.М. Зайцев // Сельскохозяйственная биология. - 2017. - т. 52. - № 2. - С. 274-281.
5. Багиров, В.А. Оценка репродуктивного потенциала производителей с помощью лабораторных исследований спермы / В.А. Багиров, Б.С. Иолчиев, А.В. Таджиева, П.М. Кленовицкий // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2015. - № 1-2. - С. 51-54.
6. Иолчиев, Б.С. Митохондриальная дисфункция и активность сперматозоидов быков / Б.С. Иолчиев, С.М. Борунова, О.Э. Бадмаев, Р.Б. Иолчиев, А.В. Таджиева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2018. - № 3 (161). - С. 118-122.
7. Никиткина, Е.В. Сравнительная характеристика повреждений сперматозоидов быков и жеребцов при криоконсервации / Е.В. Никиткина // Ветеринарная патология. - 2007. - № 4. - С. 220-221.

Таблица 1. Влияние криоконсервации на качество спермы и структуру ядра сперматозоидов (n=35)

Показатель	Сперма		t _d
	нативная	оттаянная	
Объём, мл	54,5 ± 3,88	-	-
Концентрация, млн/мл	216,8 ± 15,27	-	-
Сперматозоиды с ППД, %	42,7 ± 2,69	17,7 ± 1,73	7,81***
Выживаемость, час	117,0 ± 12,35	48,5 ± 5,74	5,03***
Форма ядра нормальная, %	94,7 ± 1,42	92,3 ± 1,56	1,16
Хроматин ядра зрелый, %	99,7 ± 0,18	99,1 ± 0,32	1,85
Хроматин ядра вакуолизированный, %	1,2 ± 0,44	2,7 ± 0,54	2,19*
Разрушенный хроматин, %	0,5 ± 0,22	1,1 ± 0,42	1,13

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$