

УДК 577.2;619;636.018.033.035

UDC 57.083.12

16.00.00 Ветеринарные науки

Veterinary Sciences

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
СПЕРМЫ БАРАНОВ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОЙ
ПОРОДЫ ПРИ ВНЕСЕНИИ ЕЕ В СРЕДЫ ДЛЯ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF
SPERM FUNCTIONAL PARAMETERS OF
SHEEP NORTH CAUCASIAN BREED WHEN
YOU MAKE IT TO THE MEDIA FOR IN VITRO
FERTILIZATION**

Гвоздецкий Николай Алексеевич

Gvozdetskiy Nikolai Alekseevich

ID автора в РИНЦ = 878155

ID of the author in RSCI = 878155

аспирант кафедры терапии и фармакологии,
факультета ветеринарной медицины

postgraduate student of the Chair of the of
Pharmacology and Therapy

*ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный
аграрный университет, г. Ставрополь, Россия.*

Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia

E-mail: hotel_2012@list.ru

E-mail: hotel_2012@list.ru

Рациональное использование интенсивных методов воспроизводства стада позволит повысить продуктивность овец и рентабельность отрасли в целом. Одним из таких методов является экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Для успешного проведения процедуры экстракорпорального оплодотворения важным требованием является наличие качественных питательных сред, позволяющих сохранить генетический материал и способствующие дальнейшему развитию зиготы. Основным требованием к средам для спермы является способность сред не вызывать их агглютинацию. Целью нашей работы явился поиск новых методов снижения агглютинации спермиев при подготовке свежеполученной спермы к процессу оплодотворения in vitro. Для ликвидации агглютинации спермиев на этапе подготовки спермы, мы использовали ГЦЖ среду, с последующим снесением семенного материала в среду SOFw, что позволило достичь значительного (практически в 15 раз!) снижения числа связанных сперматозоидов. По нашему мнению, снижение агглютинации в ГЦЖ буфере связано со специфическим влиянием входящих в его состав компонентов на спермии. Вывод: Таким образом, предложенный нами метод подготовки свежеполученной спермы для экстракорпорального оплодотворения позволяет достичь резкого снижения агглютинации сперматозоидов, что обеспечит повышение оплодотворяемости яйцеклеток в процессе получения эмбрионов овец in vitro

The article presents the use of intensive methods of diet herd reproduction that will increase the productivity and profitability of the sheep industry. One of such methods is in vitro fertilization (IVF). For the success of in vitro fertilization procedure, an important requirement is the availability of high-quality nutrient media, which help to preserve the genetic material and contribute to the further development of the zygote. The main requirement to the media for sperm is the ability of media not to cause their agglutination. The aim of our work was to search for new ways to reduce the agglutination of spermatozoa in the preparation of freshly prepared sperm in the process of production of embryos in vitro. To eliminate the agglutination of spermatozoa in the semen preparation stage, we used GCY medium, followed by demolition of seed in SOFw environment, which has resulted in a significant (almost 15 times!) reduce of the number of bound sperm. In our opinion, a decrease in agglutination in GCY buffer was connected with a specific influence of the constituent components of sperm.

Conclusion: Thus, our method of preparation of freshly prepared sperm for in vitro fertilization allows a sharp decline in sperm agglutination, which will improve the fertility of eggs during the production of embryos in vitro sheep

Ключевые слова: СПЕРМА, АГГЛЮТИНАЦИЯ,
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ,
БАРАНЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Keywords: SPERM, AGGLUTINATION, IN VITRO
FERTILIZATION, SHEEP, NUTRIENT MEDIA

Doi: 10.21515/1990-4665-121-054

Введение

Искусственное осеменение (ИО) является важным и эффективным инструментом для генетического улучшения многих хозяйственно полезных качеств овец. Внедрение новых репродуктивных технологий, связанных с использованием процесса экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и получения эмбрионов *in vitro* является важным направлением в современном животноводстве и активно развивается во всем мире [1,6]. Однако, в настоящее время в России этот метод практически не применяется в связи с его сложностью и отсутствием серьезных научных исследований отечественных ученых в этом направлении.

Одной из проблем, возникающих при выполнении экстракорпорального оплодотворения является качество спермы, используемой для этого процесса. Если при оплодотворении внутри организма животного требуется наличие единичных спермиев в яйцеводе, то при выполнении ЭКО в контакт с клеткой должны вступить миллионы спермиев [3,4]. Одним из важнейших шагов в ЭКО овец является сохранение спермиев либо в жидком или замороженном состоянии. Не смотря на то, что криоконсервация спермиев барана может значительно продлить их срок хранения, остается риск повреждения сперматозоидов вследствие замерзания-оттаивания из-за образования внутриклеточного и внеклеточного льда, холодового шока, химической токсичности криопротекторов, осмотической травмы, оксидативного повреждения и апоптоза, что может привести к серьезному повреждению структуры сперматозоидов и оплодотворяющей способности [2,7]. В ряде случаев причиной низкой фертильности спермиев при проведении ЭКО является повышенная их агглютинация при внесении в культуральную среду.

Агглютинация или склеивание сперматозоидов — один из показателей спермограммы, который отражает наличие в сперме явления

склеивания сперматозоидов и степень этого склеивания. Агглютинация сперматозоидов — патологическое состояние, являющееся одной из причин мужского бесплодия, однако даже у полностью здорового мужчины может содержаться некоторое количество слипшихся спермиев. В норме спермии несут отрицательный электрический заряд и поэтому отталкиваются друг от друга и от других клеток, при нарушении этого механизма и развивается агглютинация.

Различают два вида этого патологического процесса:

1. Истинная агглютинация — так называется явление склеивания сперматозоидов между собой. Спермии могут склеиваться хвостами, головками или образуя комплексное слипание головкой и хвостом. Слипшиеся между собой сперматозоиды теряют подвижность и теряют функции, позволяющие им оплодотворить яйцеклетку, в результате развивается мужское бесплодие.
2. Ложная (неспецифическая) агглютинация — процесс слипания сперматозоидов не друг с другом, а с клетками эпителия, макрофагами, частицами разрушенных клеток, слизью и другими составляющими семенной жидкости. Скорость спермиев при этом тоже теряется.

Обычно для подготовки спермы и индукции капацитации используется внесение свежеполученной спермы в раствор SOF wash [6]. Однако при проведении экспериментов нами часто наблюдалась интенсивная агглютинация после попадания спермиев в эту среду, приводящая к крайне низкому выходу зигот в процессе ЭКО. В доступной нам литературе практически не имеется данных о методах предотвращения агглютинации спермиев при проведении процедуры ЭКО с использованием свежеполученной спермы, так как большинство авторов предпочитают использовать для работы свежемороженый материал [5].

Известен способ приготовления синтетической среды для разбавления и замораживания спермы баранов, включающая лактозу, ксилит, трис-(оксиметил)-аминометан, трилон-б, глицерин, желток куриного яйца, дистиллированную воду, отличающаяся тем, что среда дополнительно содержит костный клей при следующем соотношении ингредиентов, мас. %: лактоза 6,0, костный клей 1,8, ксилит 0,18, трис-(оксиметил)-аминометан 0,07, трилон-б 0,1, глицерин 4,3, желток куриного яйца 14,2, вода дистиллированная до 100 (8).

Для оплодотворения используется замороженная сперма, что снижает ее качество и эффективность процесса оплодотворения.

Известен способ получения зародышей овец после созревания и оплодотворения ооцитов и культивирования зародышей *in vitro*, включающий использование свежеполученной спермы барана, 100 мкл которой помещают в 1 мл среды SOF с добавлением 20 мМ NEPES и 8 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 45 минут инкубируют в термостате при 39°C. Далее супернатант в объеме 800 мкл отбирают в новую пробирку, дважды отмывают в 3 мл среды с центрифугированием при 200 оборотах в течение 3 минут. Для оплодотворения используют объем 5 мкл с содержанием сперматозоидов 1 000 000 в мл, который добавляют в каплю среды с добавлением 20 % инактивированной сыворотки овец во время течки объемом 45 мкл, находящуюся под парафиновым маслом из расчета 10 ооцитов в одной капле (9)

Способ имеет ряд недостатков. Для капцитации спермиев используется инактивированная сыворотка крови овец во время течки, добавляемая в среду оплодотворения, что не является оптимальным методом, так как ее состав может существенно варьировать, а это не позволяет стандартизировать условия оплодотворения ооцитов.

Целью нашей работы явился поиск новых методов снижения

агглютинации спермиев при подготовке свежеполученной спермы к процессу оплодотворения *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе лаборатории вспомогательных репродуктивных технологий Научно – диагностического и лечебного ветеринарного центра ФГБОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет в период с января по май 2014 года.

Объектом исследования служили бараны северо – кавказской породы в возрасте 2 – 3 лет в количестве 10 голов. Получение спермы проводили у каждого животного два раза в неделю с интервалом в 2 дня. Всего было выполнено 10 экспериментов. Сперму получали в манеже пункта искусственного осеменения уретральным методом, используя искусственную вагину. Микроскопическую оценку качества спермы на разных этапах исследования проводили при помощи микроскопа «Микмед-2» (ЛОМО, Россия) согласно методическим рекомендациям (С. И. Новопашина, 2013).

Для подготовки спермы к оплодотворению мы использовали разработанную нами комбинированную методику, согласно которой предварительно сперма вносится в глюкозо-цитратно – желточный разбавитель (ГЦЖ), приготовленный по ГОСТ 14746 – 69 (глюкоза медицинская безводная – 30,0 г., натрий лимоннокислый трехзамещенный, пятиводный – 14,0 г., желток куриного яйца – 200,0 мл., спермосан 3 – 750 - 900 тыс.ед., вода дистиллированная – 1000,0 мл). После чего переносится в среду SOF wash, приготовленную без глюкозы и глутамина (Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., 2003) с добавлением 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,2 мг/мл кофеина и гепарина 50 мкг/мл.

Мы сравнивали подготовку спермы по двум методам: 1) с использованием ГЦЖ среды перед внесением в SOF w; 2) без

использования ГЦЖ среды перед внесением в SOF w.

Методика с использованием ГЦЖ среды была выполнена следующим образом: в пробирку типа эппендорф (2 мл) вносили 450 мкл ГЦЖ среды и 50 мкл свежеполученной спермы, тщательно перемешивали. Затем центрифугировали 3 минуты при 200 G, удаляли супернатант и ресуспендировали в 200 мкл свежей ГЦЖ среды. Пробирку помещали в термостат на 15 минут ($T = 38,5 \text{ C}$; 5% CO_2) для выполнения процедуры swim up. Технология swim-up необходима в целях удаления семенной плазмы и получения максимально полноценной фракции прогрессивно подвижных спермиев (Irvine et al, 2000 ; Zini et al, 1993 , 2009). Погибшие и агглютинировавшие спермии оседают на дно пробирки, а активные находятся в верхнем слое надосадочной жидкости (Henkel et al., 2003). В это же время происходит капацитация, то есть приобретение спермиями оплодотворяющей способности (Л. В. Голубец и др., 2010). После инкубации надосадочную жидкость, содержащую живые спермии, отбирали и переносили в пробирку, содержащую 200 мкл среды SOF w. Пробирку помещали в термостат на 15 минут для повторения процедуры swim up. После чего проводили оценку качества сперматозоидов.

Методика без использования ГЦЖ среды была выполнена следующим образом: 50 мкл свежеполученной спермы сразу вносили в пробирку, содержащую 450 мкл среды SOF w, как это описано в статье (Henkel et al., 2003). Центрифугировали 3 минуты при 200 G. Затем удаляли супернатант и ресуспендировали в 200 мкл среды SOF w. Пробирку помещали в термостат на 15 минут (swim up). После чего проводили оценку качества сперматозоидов.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью критерия Стьюдента в программе «Primer of Biostatistic 3. 01» для Windows на IBM совместимом компьютере. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Результаты исследований и обсуждение

Параметры сравнения		He разбавленная	SOF w	SOF w + ГЦЖ среда
Агглютинация сперматозоидов в %, M±m	Свежеполученная сперма	4.00 ± 0.47	-	
	До процедуры swim up (n=10)	-	61.00 ± 2.05	1.60± 0.40*
	После процедуры swim up (n=10)	-	45.50 ± 1.35 [#]	3.00 ± 0.33* [#]

Таблица 1. Сравнительная характеристика функциональных показателей спермы баранов применяемых для ЭКО при использовании различных сред

Примечание: * - различия со спермой, внесенной сразу в SOF w достоверны при $p < 0,05$; # - различия со спермой до проведения процедуры swim-up достоверны при $p < 0,05$.

Результаты оценки параметров спермы сразу после получения и при различных условиях подготовки к ЭКО приведены в таблице 1.

Также отмечено, что после процедуры swim up в среде SOF w активность сперматозоидов, не подвергшихся агглютинации увеличилась на 0,8 балла. В SOF w + ГЦЖ среде активность достоверно не изменилась и осталась высокой.

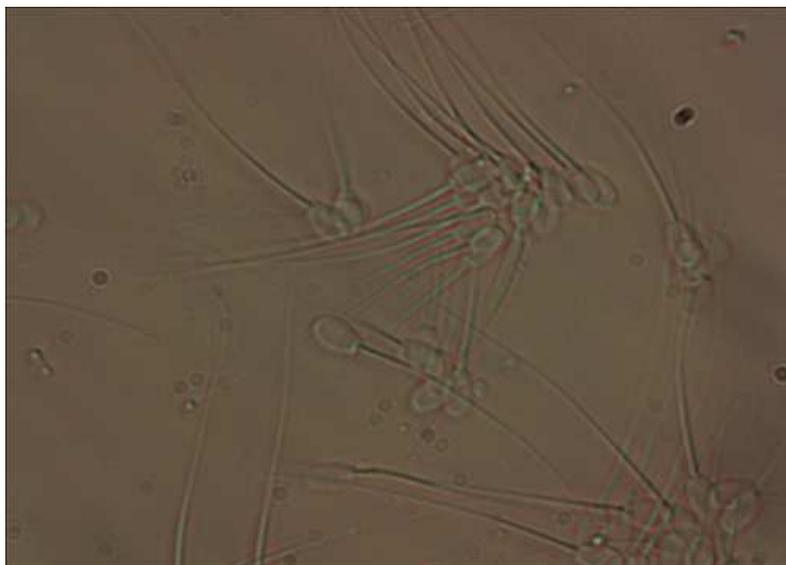


Рис. 1. Агглютинация сперматозоидов.

При сравнении степени агглютинации установлено, что при помещении сперматозоидов сразу в среду SOF w агглютинация на 59,4% больше, чем при помещении спермиев предварительно в ГЦЖ-среде (Рис.1). Однако отмечено, что после процедуры swim up в среде SOF w агглютинация снижается на 15,5 %, а в SOF w + ГЦЖ среде увеличивается на 1,4 %. Но анализ абсолютных значений показателя агглютинации показывает, что после процедуры swim up агглютинация в среде SOF w + ГЦЖ в 15 (!) раз меньше, чем при помещении спермиев сразу в среду SOF w.

В связи с этим, возможно авторами и не уделялось такого внимания агглютинации, так как они использовали сперму замороженную, то есть, прошедшую этап подготовки в разбавителе. Однако мы считаем, так же, как ряд зарубежных исследователей, что предпочтительной является работа со свежей спермой потому, что количество активных спермиев в

ней значительно выше, чем в замороженной сперме (L. O'Hara., J et al., 2009). Спермии в свежеполученной сперме обладают большей оплодотворяющей способностью, чем в заморожено – оттаянной (Watson, 2000; Niu et al., 2006). Жизнеспособность спермиев после криоконсервации и оттаивания снижается с 85,6 до 34,3 % (Hiemstra et al., 2005; Marco – Jimenez et al., 2006). Тем более после криоконсервации может быть изменен механизм процесса капацитации, что существенно влияет на фертильность сперматозоидов (Maxwell and Watson, 1996; Morrier et al., 2002).

Для ликвидации агглютинации спермиев на этапе подготовки спермы мы использовали ГЦЖ среду, с последующим снесением семенного материала в среду SOFw, что позволило достичь значительного (практически в 15 раз!) снижения числа связанных сперматозоидов. По нашему мнению снижение агглютинации в ГЦЖ буфере связано с со специфическим влиянием входящих в его состав компонентов на спермии.

Вывод: Таким образом, предложенный нами метод подготовки свежеполученной спермы для экстракорпорального оплодотворения позволяет достичь резкого снижения агглютинации сперматозоидов, что обеспечит повышение оплодотворяемости яйцеклеток в процессе получения эмбрионов овец *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Багиров В.А. /Фертильность сперматозоидов и состояние хроматина /Сельскохозяйственная биология. – 2012. - №2. – с. 3 – 12.
2. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии). / Под общ. ред. проф. Дьяконова Л.П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с.
3. Salamon, S. Storage of ram semen / S. Salamon, W.M.C. Maxwell // Animal Reproduction Science. – 2000. – № 69. – p. 77-111.
4. Cownie, Y. Current status of embryo technologies in sheep and goat / Y. Cownie, G. Baril, N. Poulin, P. Mermillod // Theriogenology. – 2003. - № 59. – p. 171 – 188.
5. Трухачев, В.И., Трансплантация зародышей у овец/ В.И.Трухачев, В.Я.Никитин, В.М.Михайлюк, Н.В.Белугин, Н.А.Писаренко, В.С.Скрипкин. // Российский Ветеринарный Журнал. М.: КолосС. 2007. 36 с.
6. Пат. 2525714 Российская Федерация, МПК: А01К67/02, А61D19/04. Способ

получения эмбрионов овец *in vitro*/ Трухачев В.И., Криворучко А.Ю., Беляев В.А., Квочко А.Н., Шахова В.Н.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО "Ставропольский государственный аграрный университет». – № 2013121616/10 ; заявл. 07.05.2013 ; опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23. – 19 с.

7. Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y., et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. //– J Clin Invest. – 1995. Dec;96(6):2882-91.

8. Пат. 2436299 Российская Федерация, МПК: A01N 1/02 , A61D 19/02, C12N 5/02. Среда для криоконсервации спермы козлов/ Аксенова П.В., Айбазов А.-М. заявитель и патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства Российской академии. – № 2010118373/13 ; заявл. 06.05.2010 ; опубл. 20.12.2011. – 9 с.

9. The Effect of Macromolecule Source and Type of Media During *in vitro* Maturation of Sheep Oocytes on Subsequent Embryo Development. / A. Shirazi, M. A. Ardali, E. Ahmadi, H. Nazari., M. Mamuee, B. Heidari. // J. Reprod. Infertil. – 2012. Vol. 13, № 1. – P. 13-19.

References

1. Bagirov V.A. /Fertil'nost' spermatozoidov i sostojanie hromatina /Sel'skhozjajstvennaja biologija. – 2012. - №2. – s. 3 – 12.

2. D'jakonov, L.P. Zhivotnaja kletka v kul'ture (Metody i primenenie v biotekhnologii). / Pod obshh. red. prof. D'jakonova L.P. – М.: Izdatel'stvo «Sputnik+», 2009. – 656 s.

3. Salamon, S. Storage of ram semen / S. Salamon, W.M.C. Maxwell // Animal Reproduction Science. – 2000. – № 69. – r. 77-111.

4. Cownie, Y. Current status of embryo technologies in sheep and goat / Y. Cownie, G. Baril, N. Poulin, P. Mermillod // Theriogenology. – 2003. - № 59. – p. 171 – 188.

5. Truhachev, V.I., Transplantacija zarodyshej u ovec/ V.I.Truhachev, V.Ja.Nikitin, V.M.Mihajljuk, N.V.Belugin, N.A.Pisarenko, V.S.Skripkin. // Rossijskij Veterinarnyj Zhurnal. М.: KolosS. 2007. 36 s.

6. Пат. 2525714 Rossijskaja Federacija, МПК: A01K67/02, A61D19/04. Sposob poluchenija jembrionov ovec *in vitro*/ Truhachev V.I., Krivoruchko A.Ju., Beljaev V.A., Kvochko A.N., Shahova V.N.; zajavitel' i patentoobladatel' FGBOU VO "Stavropol'skij gosudarstvennyj agrarnyj universitet». – № 2013121616/10 ; zajavl. 07.05.2013 ; opubl. 20.08.2014, Bjul. № 23. – 19 s.

7. Watson A.D., Berliner J.A., Hama S.Y., et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. //– J Clin Invest. – 1995. Dec;96(6):2882-91.

8. Пат. 2436299 Rossijskaja Federacija, МПК: A01N 1/02 , A61D 19/02, C12N 5/02. Sreda dlja kriokonservacii spermy kozlov/ Aksenova P.V., Ajbazov A.-M. zajavitel' i patentoobladatel' Stavropol'skij nauchno-issledovatel'skij institut zhivotnovodstva i kormoproizvodstva Rossijskoj akademii. – № 2010118373/13 ; zajavl. 06.05.2010 ; opubl. 20.12.2011. – 9 s.

9. The Effect of Macromolecule Source and Type of Media During *in vitro* Maturation of Sheep Oocytes on Subsequent Embryo Development. / A. Shirazi, M. A. Ardali, E. Ahmadi, H. Nazari., M. Mamuee, B. Heidari. // J. Reprod. Infertil. – 2012. Vol. 13, № 1. – R. 13-19.