

УДК 612.616.636.72.74.57.086.13.661.185.6

ЦІЛІСНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ТА АКРОСОМ РОЗМОРОЖЕНИХ СПЕРМІЇВ ПСІВ ЗА ДОДАВАННЯ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ ДО СЕРЕДОВИЩА

А. Р. Корбецький
korbetskyu.andriy@inenbiol.com.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів 79034, Україна

У статті наведено результати досліджень впливу різних концентрацій додецилсульфата натрію (ДСН) у порівнянні з середовищами без нього та з комерційною ОЕР пастою у складі середовища для кріоконсервації сперми псів на активність, цілісність плазматичних мембран та акросом спермій. У результаті проведених досліджень було встановлено, що рухливість спермій одразу після розморожування була найвищою в ДСН групі порівняно з ОЕР групою ($60,2 \pm 7,4$ %). З-поміж ДСН груп найвища рухливість спермій була в групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл ($61,6 \pm 8,7$ %) тоді як у групі із концентрацією ДСН 4 мг/мл, рухливість була найнижчою ($37,0 \pm 9,3$ %) з вірогідною різницею в порівнянні з іншими групами ($p < 0,05$). Найбільше спермій з неушкодженими мембранами одразу після розморожування було в ОЕР групі ($64,7 \pm 12,4$ %). З-поміж ДСН груп найвища кількість була в групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл ($63,2 \pm 9,4$ %) і найнижчою — з концентрацією ДСН 4 мг/мл ($39,1 \pm 10,6$ %). У результаті дослідження не спостерігалось

вірогідних різниць між всіма ДСН групами, за виключенням групи з концентрацією ДСН 4 мг/мл, одразу після розморожування між всіма групами, включаючи ОЕР групу. Кількість спермій з неушкодженими акросомами була від 73,5 до 94,7 % (середнє: $84,1 \pm 6,8$ %) перед заморожуванням. Одразу після розморожування, кількість спермій з неушкодженими акросомами становила $51,2 \pm 11,3$ % і $49,7 \pm 10,5$ % у групах з 2 мг/мл ДСН і ОЕР відповідно; показники були вірогідно нижчі, ніж перед заморожуванням ($p < 0,01$). Однак, не було знайдено значимої різниці між двома цими групами. Середовище для заморожування сперми псів, що містило 2 мг/мл ДСН мало однаково високу ефективність як і середовище, що містило в своєму складі 0,75 % ОЕР.

Ключові слова: СПЕРМА ПСІВ, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ, ЦІЛІСНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН, ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ АКРОСОМ, ДЕТЕРГЕНТ

PLASMA MEMBRANE AND ACROSOME INTEGRITY OF THAWED DOG SEMEN AFTER ADDITION OF SODIUM DODECYL SULFATE TO THE FREEZING EXTENDER

A. R. Korbetskyu
korbetskyu.andriy@inenbiol.com.ua

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv 79034, st. Stus 38, Ukraine

The study results of influence of different sodium dodecyl sulfate (SDS) concentrations in dog semen freezing extender on motility, plasma membrane and acrosome integrity of spermatozoa have been shown. As a result, it was revealed, that sperm motility immediately after thawing was highest in the SDS group compared with OEP group (60.2 ± 7.4 %). The highest sperm motility among SDS groups was in a group of SDS

concentration of 2 mg/ml (61.6 ± 8.7 %) while in the group of 4 mg/mL SDS concentration, motility was the lowest (37.0 ± 9.3 %) with a significant difference compared with other groups ($p < 0.05$). Most of spermatozoa with intact membranes immediately after thawing was in the OEP group (64.7 ± 12.4 %). Among the SDS groups, the highest numbers were in the group with 2 mg/ml SDS concentration (63.2 ± 9.4 %) and the lowest

was in a group of SDS concentration of 4 mg/ml (39.1±10.6 %). The study showed no significant difference between all of SDS groups, with the exception of 4 mg/ml SDS concentration immediately after thawing between all groups including OEP group. Number of spermatozoa with intact acrosome was from 73.5 to 94.7 % (mean: 84.1±6.8 %) before freezing. Immediately after thawing, the number of sperm with intact acrosome was 51.2±11.3 % and 49.7±10.5 % in groups of 2 mg/ml SDS and OEP group, respectively, values were significantly lower than

before freezing ($p<0.01$). However, no significant difference was found between the two groups. Freezing extender for dog semen that contained 2 mg/ml SDS equally shown higher effectiveness then extender supplemented with 0.75 % OEP.

Keywords: DOGS SPERM, CRYOPRESERVATION, PLASMA MEMBRANE INTEGRITY, ACROSOME PRESERVATION, DETERGENT

ЦЕЛОСТНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН И АКРОСОМ РАЗМОРОЖЕННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ КОБЕЛЕЙ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ К СРЕДЕ

А. Р. Корбецький
korbetskyu.andriy@inenbiol.com.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38г. Львов 79034, Украина

В статье приведены результаты исследований влияния различных концентраций детергента додецилсульфата натрия (ДСН) по сравнению со средами без него и с коммерческой ОЕР пастой в составе среды для криоконсервации спермы собак на активность, целостность плазматических мембран и акросом спермиев. В результате проведенных исследований было установлено, что подвижность спермиев сразу после размораживания была самой высокой в ДСН группах по сравнению с ОЭР группой (60,2±7,4 %). Из ДСН групп высокая подвижность спермиев была в группе с концентрацией ДСН 2 мг/мл (61,6±8,7 %) в сравнении к группе с концентрацией ДСН 4 мг/мл, подвижность была низкой (37,0±9,3 %) с вероятной разницей по сравнению с другими группами ($p<0,05$). Больше спермиев с неповрежденными мембранами сразу после размораживания, в ОЕР группе (64,7±12,4 %). Из ДСН групп, высокое количество было в группе с концентрацией ДСН 2 мг/мл (63,2±9,4 %) и низкое было в группе с концентрацией ДСН 4 мг/мл (39,1±10,6 %). В результате исследования не наблюдалось достоверных различий между всеми ДСН группами, исключая группы с концентрацией ДСН 4 мг/мл, сразу после размораживания между всеми группами включая ОЕР группу. Количество спермиев с неповрежденными акросомами было от 73,5 до 94,7 % (среднее:

84,1±6,8 %) перед замораживанием. Сразу после размораживания, количество спермиев с неповрежденными акросомами составила 51,2±11,3 % и 49,7±10,5 % в группах с 2 мг/мл ДСН и ОЕР соответственно; показатели были достоверно ниже, чем перед замораживанием ($p<0,01$). Однако, не было найдено значимой разницы между двумя этими группами. Среда для замораживания спермы собак с 2 мг/мл ДСН мало одинаково высокую эффективность, как и среда имевшая в своем составе 0,75 % ОЕР.

Ключевые слова: СПЕРМА СОБАК, КРИОКОНСЕРВАЦИЯ, ЦЕЛОСТНОСТЬ МЕМБРАН, СОХРАННОСТЬ АКРОСОМ, ДЕТЕРГЕНТИ

Процес криоконсервації сперми псів чинить негативний вплив на спермії і, зокрема ушкоджуються плазматичні мембрани в результаті холодового шоку, осмотичного стресу, дегідратації та кристалізації води [1]. Окрім режимів заморожування та застосування криопротекторів, важливу роль відіграють речовини, які спрямовано додають до середовища для зміцнення плазматичних мембран, які шляхом їх модифікацій і стабілізації (фортифікації) знижують вплив негативних факторів на них [2].

У стандартних середовищах для кріоконсервації сперми псів використовується жовток курячого яйця, мембраностабілізуючі компоненти якого адсорбуються на поверхні плазматичної мембрани спермій, утворюючи іонні та водневі зв'язки, підвищуючи її стійкість до кріогенних ушкоджуючих факторів [3]. Компоненти жовтка при звичайному додаванні до водного середовища знаходяться в ньому у вигляді мікрокульок, що забезпечує неповний їхній контакт з поверхнею плазматичних мембран. Для підвищення ефективності контакту компонентів жовтка з плазматичними мембранами при кріоконсервації сперми багатьох видів тварин, у тому числі і псів, використовується ОЕР паста, яка в своєму складі містить детергент лаурилсульфат натрію та триетаноламін, які емульгують мікрокульки жовтка, що в результаті сприяє зростанню площі контакту ефективних компонентів жовтка з плазматичними мембранами спермія і відповідно більш ефективний їхній захист [4].

Отже, ОЕР є дуже важливим компонентом середовища при підготовці сперми псів для заморожування [5, 6]. Дослідники [7] застосовували у середовищі для кріоконсервації сперми кнурів натрію лаурилсульфат (НЛС) у концентрації від (1,2 до 1,6 мг/мл) замість ОЕП і показали, що кількість спермій з неушкодженими акросомами і вищою рухливістю після розморожування із додаванням НЛС була на такому ж рівні, як із додаванням ОЕП. Більше того, багатьма дослідженнями було показано доцільність застосування ДСН у середовищі для кріоконсервації в інших видів тварин (бугаї [8], миші [9], кози [10] і кнурі [11]).

Враховуючи високу вартість ОЕП пасти, вивчення впливу різних концентрацій детергенту додецилсульфат натрію в складі середовищ для кріоконсервації сперми псів з метою використання як альтернатива ОЕП пасти і

вивчення його впливу на плазматичні мембрани призведе до здешевлення виготовлення середовищ для кріоконсервації сперми псів та зменшення залежності від імпорту спеціалізованих добавок до середовищ для кріоконсервації сперми тварин.

Матеріали і методи

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

Всі маніпуляції з тваринами проводились в дослідній клініці лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Сперму від псів відбирали два рази на тиждень. 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], у ПВХ рукавиці, методом мастурбації в попередньо підігріті до температури 37 °С стерильні лійки та градуйовані пластикові пробірки об'ємом 15 мл. Для досліджень використовували тільки другу фракцію еякуляту. Після взяття сперма переносилась у водяний термостат (37 °С) для оцінки якості і подальших технологічних процедур.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), рухливістю (%) та концентрацією спермій. Для заморожування використовували 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 °С). Деконсервацію спермій проводили у водяному термостаті при 70 °С впродовж 8 с з подальшим перенесенням у водяний термостат з 37 °С.

Цілісність плазматичних мембран визначали за допомогою тесту гіпоосмотичного набрякання спермій (ТГОНС) [12]. У пробірку вносили 10 мкл досліджуваної сперми і 100 мкл гіпотонічного розчину, перемішували і ставили в термостат при 37 °С на 30 хв. Досліджували на фазово-контрастному мікроскопі при загальному збільшенні x 400. Підраховували щонайменше 200 спермій, ділячи їх на дві групи: спермії з закрученими хвостами (з неушкодженими мембранами) і спермії з рівними хвостами (з ушкодженими мембранами), виражаючи перші у відсотках.

Цілісність акросом спермій визначали за допомогою маркерного ферменту акрозину, який знаходиться в неушкодженій акросомі [13]. При порушенні цілісності акросомальної мембрани акрозин разом з іншим вмістимим акросом виходить в оточуюче

спермії середовище. Зростання активності акрозину в середовищі прямо пропорційне ступеню ушкодження акросом. Збереженість акросом (ЗА) вираховували за формулою:

$$ЗА\% = 100 \times \frac{\text{Амакс} - \text{Азразок}}{\text{Амакс}}$$

де:

Амакс— активність акрозину в середовищі при примусовому ушкодженні акросом у суспензії свіжоотриманих спермій з концентрацією 100×10^6 спермій/мл за допомогою Triton X-100, вважалось що ушкодилось 100 % акросом спермій;

Азразок— активність акрозину в дослідному зразку.

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

Результати й обговорення

Рухливість спермій одразу після розморожування була найвищою в ДСН групі порівняно з ОЕР групою (60,2±7,4 %,табл. 1).

Таблиця 1

Рухливість спермій при інкубуванні деконсервованої сперми псів за різних концентрацій ДСН у розріджувачі (n=9, M±m)

| Час після розморожування, год | Рухливість, % | | | | | |
|-------------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,75% ОЕР | 0 мг/мл ДСН | 1 мг/мл ДСН | 2 мг/мл ДСН | 3 мг/мл ДСН | 4 мг/мл ДСН |
| 0 | 60,2±13,1 | 42,6±11,4** | 54,9±12,7 | 61,6±8,7* | 56,3±10,5 | 37,0±9,3* |
| 1 | 53,3±10,8 | 35,6±9,8* | 43,2±10,6 | 54,1±8,1 | 45,8±9,5 | 24,5±8,1** |
| 2 | 43,1±10,2 | 28,7±9,4* | 34,5±8,4 | 43,8±7,4 | 35,7±8,1 | 16,4±6,4* |
| 4 | 25,3±7,4 | 12,1±7,3** | 19,3±5,2* | 24,6±6,5 | 17,4±6,3* | 9,5±4,2** |
| 8 | 6,4±3,1 | 5,8±2,5 | 6,3±3,6 | 6,8±3,1 | 5,9±2,9 | 5,3±2,1 |

Примітка: у цій і наступній таблицях статистично вірогідні різниці стосовно ОЕР групи: * — p<0,05; ** — p<0,01

З-поміж ДСН груп найвища рухливість спермій була у групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл (61,6±8,7 %) тоді як у групі із концентрацією ДСН 4 мг/мл, рухливість була найнижчою (37,0±9,3 %) з вірогідною різницею в порівнянні з іншими групами (p<0,05).

Через 1 і 2 год після розморожування, рухливість спермій у

дослідній групі з ОЕР вірогідно не відрізнялась від групи з концентрацією ДСН 2 мг/мл; також не спостерігалось вірогідної різниці між ОЕР групою та 1 і 3 мг/мл ДСН групами. При більш тривалій інкубації спостерігалась вірогідно нижча рухливість через 4 год у групах з концентрацією ДСН 0 мг/мл, 1 мг/мл та 4 мг/мл. Через 8 год після розморожування

між всіма групами не встановлено вірогідної різниці.

Кількість спермійів з неушкодженими мембранами при інкубуванні розмороженої сперми у контрольній і дослідних групах показано в таблиці 2. Найбільше спермійів з неушкодженими мембранами одразу після розморожування було в ОЕР групі (64,7±12,4 %). З-поміж ДСН груп найвища кількість була в групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл (63,2±9,4 %) і найнижчою — з концентрацією ДСН 4 мг/мл

(39,1±10,6 %). У результаті дослідження не спостерігалось вірогідних різниць між всіма ДСН групами, за виключенням групи з концентрацією ДСН 4 мг/мл, одразу після розморожування між всіма групами, включаючи ОЕР групу. Однак, при інкубації після розморожування від 1 до 8 год, ступінь ушкодження спермійів в ОЕР групі був нижчим, ніж у ДСН групах. У групі з концентрацією 4 мг/мл ступінь ушкодження спермійів був вірогідно вищий, ніж в групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл через 8 год після розморожування ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Цілісність плазматичних мембран спермійів псів деконсервованої сперми за різних концентрацій ДСН у розріджувачі (n=9, M±m)

| Час після розморожування, год | Рухливість, % | | | | | |
|-------------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0,75% ОЕР | 0 мг/мл ДСН | 1 мг/мл ДСН | 2 мг/мл ДСН | 3 мг/мл ДСН | 4 мг/мл ДСН |
| 0 | 64,7±12,4 | 57,4±10,3 | 61,5±12,4 | 63,2±9,4 | 62,3±10,8 | 39,1±10,6* |
| 1 | 55,2±11,8 | 40,6±8,6* | 53,1±12,1 | 58,3±8,5 | 52,3±9,9 | 31,3±7,3** |
| 2 | 48,6±9,3 | 28,3±9,2* | 45,6±10,3 | 46,4±7,9 | 42,6±9,1 | 26,1±7,0* |
| 4 | 41,5±8,8 | 17,8±5,3** | 38,9±8,5 | 32,2±8,1 | 29,1±8,2 | 17,8±6,5* |
| 8 | 24,9±8,1 | 9,4±4,1** | 16,1±7,8 | 21,7±7,3 | 13,8±6,4 | 11,4±5,2* |

Збереженість акросом спермійів перед заморожування та після розморожування, а також через 8 год інкубації в групах з концентрацією ДСН 2 мг/мл і ОЕР показано на рисунку 1. Кількість спермійів з неушкодженими акросомами була від 73,5 до 94,7 % (середнє: 84,1±6,8 %) перед заморожуванням. Одразу після деконсервації, кількість спермійів з неушкодженими акросомами становила 51,2±11,3 % і 49,7±10,5 % у групах з 2 мг/мл ДСН і ОЕР відповідно. Однак, не було знайдено вірогідної різниці між двома цими групами. Більше того, кількість спермійів з ушкодженими акросомами через 8 год після розморожування була вищою, ніж одразу після розморожування, але не спостерігалось вірогідної різниці між 2 мг/мл ДСН і ОЕР групами. У зв'язку з тим, що як ОЕР, так і ДСН є сперматоцидними речовинами [6], було необхідним встановити оптимальну концентрацію для заморожування сперми псів. Рухливість і кількість живих спермійів

була найвищою в групі з концентрацією ДСН 2 мг/мл. Оптимальною концентрацією ДСН для кнурів є межі від 1,2 до 1,6 мг/мл [4], 0,035 % — в мишей [9], і 0,035 % — у кіз [10]; концентрації суттєво відрізняються між різними видами. Рефа і ін. [5] показали, що виживаність і кількість живих спермійів після розморожування сперми псів зросли після додавання 0,25 % ДСН до середовища, що є дуже схожим до наших результатів. При порівнянні групи з концентрацією ДСН 2 мг/мл і групи з концентрацією 0,75 % ОЕР спостерігалась вірогідна різниця в кількості живих спермійів через 1, 2, і 8 год після розморожування.

Однак, не спостерігалось вірогідної різниці в активності спермійів між цими двома групами як одразу після розморожування, так і через 8 год інкубації. Отже, сперма псів заморожена із додаванням ДСН до середовища, покращила виживаність спермійів так само як і додавання ОЕР.



Рис. 1. Збереженість акросом перед заморожуванням, після деконсервації та через 8 год інкубації при концентрації 2 мг/мл ДСН і ОЕР в середовищі.

Збереженість акросом може бути більш важливим, ніж активність сперміїв одразу після розморожування [13] при порівнянні дослідних концентрацій ДСН. Концентрацією 2мг/мл ДСН і 0,75 % ОЕР забезпечили найвищу збереженість акросом після розморожування, тоді як між цими двома не було виявлено вірогідної різниці.

Висновки

Середовище для заморожування сперми псів, що містило 2 мг/мл ДСН, проявило свою високу ефективність на тому ж рівні, що і середовище з 0,75 % ОЕР паста, отже, може бути використана як її дешева та легкодоступна альтернатива.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним було б продовжити дослідження впливу ДСН у середовищі для кріоконсервації сперми псів у комплексі з амінокислотами, що володіють мембраностабілізуючими властивостями.

1. Witte T. S., Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 2007; 102:181–93.

2. Heber U., Tyankova L., Santarius K. A. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the

presence of amino acids. *Biochem Biophys Acta*, 1971, 241, 578–592.

3. Ponglowhapan S., Essén-Gustavsson B., Linde-Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 2004;62:1498–517.

4. Tsutsui T., Hase M., Hori T., Komoriya K., Shimizu N., Nagakubo K. and Kawakami E. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, 62: 537–538.

5. Peña A. I., Lopez-Lugilde L., Barrio M., Becerra J. J., Quintela L. A. and Herradon P. G. *Reprod. Dom. Anim.*, 2003, 38: 27–35.

6. Peña A. I., Lugilde L. L., Barrio M., Herradon P. G. and Quintela L. A. *Theriogenology*, 2003, 59: 1725–1739.

7. Kato S., Miyano T., Nanjo I., Yasui T. and Kanda S. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 1990, 36: 26–30.

8. Ahmad K. and Foote R. H. *J. Dairy Sci.*, 1986, 69: 535–541.

9. Dewit M., Marley W. S. and Graham J. K. *Cryobiology*, 2000, 40: 36–45.

10. Aboagla E. M. and Terada T. *Theriogenology*, 2004, 62: 1160–1172.

11. Graham E. F., Rajamannan A. H. J., Schmehl M. H. K., Mak-iLaurila M. and Bower R. E. *AI Digest*, 1971, 19: 12.

12. Nothling J. O., Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 2005; 63: 1469–80.

13. Lax Y., Rubinstein S., Breitbart H. Acrosin activity assay for the evaluation of mammalian sperm acrosome reaction. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 253, 135–40.