

Виявлення пошкоджень сперматозоїдів птиці під час низькотемпературного консервування

С.В. Бичко, О.В. Дунаєва, О.Б. Артеменко, О.В. Терещенко

Інститут птахівництва Української академії аграрних наук, с. Борки, Харківська обл.

Як відомо, запліднююча здатність сперми залежить від морфологічного стану сперматозоїдів, зокрема їх акросом [16]. Зменшення числа повноцінних статевих клітин в еякуляті, а особливо наявність великої кількості сперматозоїдів з пошкодженими акросомами, призводить до зниження заплідненості яєць [5]. Це пов'язано з тим, що акросоми забезпечують проникнення сперматозоїдів в яйцеклітини [15, 19]. Тому після заморожування-відтавання статевих клітин птиці перед використанням для штучного запліднення важливо визначити їх морфо-функційний стан.

Для визначення цілісності сперматозоїдів птиці, в основному сперми півнів, розроблено досить велику кількість різноманітних методів. В 1938 році В.А. Морозов вперше описав метод фарбування статевих клітин еозином, а зараз найбільшого розповсюдження набув спосіб, в якому використовується суміш еозину та нігрозину, що базується на ступені проникливості мембран мертвих статевих клітин [9].

За методом Fiser і Fairfull (1989) [12] цілісність акросом оцінюють після фарбування реактивом Гімзе. Препарати розглядають в світловому мікроскопі під імєрсією при збільшенні $\times 100$.

Для визначення процентного складу мертвих сперматозоїдів в еякуляті застосовують такі барвники, як бромфенол синій та нігрозин (Kumar *et al*, 1959), конго червоний та нігрозин (Chatterjee *et al*, 1967), трипановий синій (Wilson *et al*, 1969) [7].

В останні роки широкого розповсюдження набула флуоресцентна мікроскопія. Для оцінювання життєздатності сперми півнів та індиків застосовують такі флуорохроми, як етідіум бромід [7; 5], карбоксидиметилфлуоресцеїн (CMFDA), Hoechst 33258, пропідіум йодид (PI), SYBR-14+PI [6, 8, 9, 10, 11].

Інформативним є визначення цілісності сперматозоїдів в скануючому електронному мікроскопі [17].

М.І. Сахацький та співавтори (1987) розробили експрес-метод оцінювання запліднюючої здатності сперми птиці, застосовуючи в якості флуорохрому суміш етідіум броміду та тіазинового червоного [4]. Аналіз виготовлених препаратів зразків сперми проводять під люмінесцентним мікроскопом.

Адреса для кореспонденції: Бичко С.В., Інститут птахівництва Української академії аграрних наук, с. Борки, Харківська обл.

Для оцінювання життєздатності сперми півнів запропоновано багато різних способів. Однак більшість з них є трудомісткими або вони вимагають наявності спеціального обладнання (флуориметр, люмінесцентний або електронний мікроскопи тощо), і тому непридатні для застосування у польових умовах.

Що стосується сперми гусаків, до теперішнього часу фізіологічний стан сперматозоїдів оцінювався такими методами, як визначення об'єму сперми, рухливості, концентрації та показника виживання статевих клітин. Однак ці методи не дають у достатній мірі інформації про функціональну повноцінність сперматозоїдів.

Таким чином, метою даної праці стало вдосконалення та пристосування до роботи зі спермою півнів і гусаків відомих та простих у виконанні методів визначення цілісності сперматозоїдів птиці, а також виявлення основних морфологічних пошкоджень статевих клітин, які відбуваються під час їх низькотемпературного консервування.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на спермі гусаків великої сірої породи та півнів породи род-айланд. Сперму одержували методом абдомінального масажу, для досліджень використовували суміші еякулятів від кількох самців.

Для визначення морфо-функціонального стану сперматозоїдів гусаків та півнів було вивчено можливість застосування методу, який передбачає диференційоване забарвлення статевих клітин індиків сумішшю родаміну С та малахітового зеленого [1]. Даний метод виконували у такій послідовності. До 0,05 М фосфатного буфера (рН=7) додавали родамін С в кількості 0,5% (І-й маточний розчин) та малахітовий зелений в концентрації 0,5% (ІІ-й маточний розчин) відповідно. Безпосередньо перед проведенням досліджень в чистий флакон набирали 1 мл маточного розчину родаміну С, додавали

1,5 мл маточного розчину малахітового зеленого і доводили середовищем до загального об'єму 5 мл. На знежирене предметне скло наносили краплинку сперми (3-5 мкл), додавали краплю (6-8 мкл) розчину свіжоприготованих барвників, акуратно перемішували скляною паличкою, витримували 10 сек. і робили мазок, подібний на мазок крові. Приготований препарат

висушували в потоці теплого повітря при 35-40°C протягом 15-20 сек.

Для визначення основних пошкоджень морфологічної структури сперматозоїдів півнів та гусаків проводили їх низькотемпературне консервування за технологіями, розробленими в Інституті птахівництва УААН.

Свіжоодержану сперму гусаків охолоджували до 0-4°C протягом 35-40 хв. і розбавляли кріозахисним середовищем Б-26 тієї ж температури у співвідношенні 1:1. Склад середовища наступний, (г): гліцин – 1,4, маніт – 0,8, лактоза – 3,0, глютамат натрію – 0,2, цитрат калію – 0,2, ацетат магнію – 0,08, кріопротектор N,N-диметилформамід (ДМФ) та 1,2-пропандіол (1,2-ПД) у співвідношенні 1:2 та кінцевій концентрації 6%, дистильована вода – до 100 мл. Використовували реактиви марки “ХЧ”, кріопротектори були додатково очищені за методом вакуумної перегонки [3]. Осмотичність середовища – 282 мОсмоль/кг, рН = 7,0. Розбавлену сперму розфасовували в пластикові соломинки (пайети) об’ємом 0,25 см³. Охолодження проводили до –196°C в парах рідкого азоту на лабораторній установці за режимом: від 0 до початку кристалізації (–5÷–10°C) швидкість охолодження становила 5°C/хв, від –10 до –90°C охолодження проводили зі швидкістю 50°C/хв., від –90 до –196°C – зі швидкістю 15°C/хв. Розморожували сперму на водяній бані при 40°C до повного зникнення кристалічної фази [2].

Сперму півнів охолоджували протягом 15-20 хв. до кімнатної температури і поступово розбавляли у співвідношенні 1:1 захисним середовищем ПІ. Склад середовища наступний (г): глютамат натрію – 2,8, глюкоза – 0,50, інозит – 0,25, ацетат магнію – 0,07, ацетат калію – 0,50, полівінілпіролідон (м.м. 12000) – 0,20, протамінсульфат – 0,028 (г/100 мл води). Осмотичність середовища становила 420 мОсмоль/кг, рН 6,8. Через 30-40 хв. еквілібрації сперму повторно розбавляли у співвідношенні 2:1 середовищем ПІ із кріопротектором. В якості кріопротектора використовували суміш диметилформамід+етиленгліколь+1,2-пропандіол, співвідношення компонентів у суміші становило 1:1:1. Кінцева концентрація кріопротектора – 8%. Після розбавлення пластикові пайети об’ємом

0,25 см³ заповнювали підготовленою спермою в камері мікротома-кріостата. Пайети зі спермою охолоджували в програмному заморожувачі УОП-3 (СКТБ ІПКіК НАНУ) зі швидкістю 3°C/хв. до початку кристалізації, витримували 1-3 хв. на плато кристалізації, потім зі швидкістю 25-30°C/хв – до –20°C, зі швидкістю 70°C/хв – до –80°C, після чого пайети занурювали у рідкий азот. Розморожували сперму на водяній бані при 40°C.

Препарати деконсервованої сперми розглядали в мікроскопі під імерсією при збільшенні $\times 1500-2250$. В полі зору враховували число нормальних та ушкоджених статевих клітин, а також встановлювали пошкодження, які найбільш часто зустрічались після заморожування-відтавання.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було проведено пристосування методики диференційованого фарбування сперматозоїдів сумішшю родаміну С та малахітового зеленого до роботи зі спермою півнів та гусаків. Для виготовлення препаратів з деконсервованої сперми було виявлено, що фосфатний буфер, який використовувався для приготування маточних розчинів барвників, при взаємодії з кріопротектором утворює кристали. Це значно ускладнює мікроскопію зразків сперми, тому аналіз препаратів майже неможливий. Тому нами було замінено фосфатний буфер на середовище для розбавлення сперми півнів ПІ та для розбавлення сперми гусаків Б-26.

Також визначено оптимальні співвідношення барвників у суміші. Встановлено, що для роботи зі спермою гусаків для приготування маточних розчинів концентрація родаміну С повинна становити 0,025%, а малахітового зеленого – 0,05-0,1%. Для фарбування сперми півнів маточні розчини барвників містять 0,05% родаміну С та 0,08% малахітового зеленого. Для виготовлення одного препарату сперми півнів слід використовувати 3 мкл суміші барвників та 12 мкл сперми. При фарбуванні сперматозоїдів гусаків на 1 частину сперми слід витратити 3 частини суміші барвників, оскільки сперма гусаків має природно нижчу концентрацію. Взаємодія статевих клітин півнів та гусаків з барвниками повинна тривати не менше 1 хв., оскільки саме за такий проміжок часу сперматозоїди повністю забарвлюються, що дає змогу отримати високоякісні препарати.

Вдосконалений метод дозволяє проводити оцінювання морфологічної цілісності та функціональної повноцінності як свіжоотриманої, так і заморожено-відтаяної сперми півнів та гусаків, а також об’єктивно оцінювати самців за фізіологічними показниками сперми і відбирати до стада лише високопродуктивних плідників. Особливістю даного методу є можливість виготовлення препаратів у польових умовах – на птахофермах та у дослідних господарствах, їх накопичення та депонування для наступного дослідження в лабораторії.

Крім того, застосування модифікованого методу диференційованого фарбування сперматозоїдів півнів і гусаків дозволяє встановити основні

пошкодження структурних частин статевих клітин, які найчастіше виникають під час їх низькотемпературного консервування. Розрізняють такі пошкодження як дефекти акросоми, голівки та хвоста.

Статеві клітини без акросом, а також такі, що мають порушення морфологічної структури (кулеподібні, стрижнеподібні, зламані або подовжені акросоми) розглядаються як аномальні (рис. 1). Це пояснюється тим, що при порушеннях цілісності акросомальної мембрани відбувається втрата протеолітичних ферментів. В даному випадку сперматозоїди втрачають запліднюючу здатність із-за неможливості здійснення penetрації перивітелінової мембрани яйцеклітин [14, 18].

Патологією форми голівок сперматозоїдів півнів та гусаків є їх перегини та роздуття (рис. 2А). Роздуті голівки мають нерівну поверхню, в 2-4 рази перевищують діаметр голівки нормального сперматозоїда. Під мікроскопом вони часто мають вигляд дифузних клітин з розірваними мембранами.

Викривлення або перегин в області шийки сперматозоїда (рис. 2Б) призводить до порушення цілісності мембран і, як наслідок, до втрати рухливості. На рухливість сперматозоїдів може значно впливати роздуття середньої частини (рис. 2В), оскільки мітохондрії, які забезпечують проходження в статевих клітинах всіх енергетичних процесів, сконцентровані саме тут [13, 19].

Закручені хвости (рис. 3) перешкоджають нормальній рухливості статевих клітин.

Слід зазначити, що під час проведення кріоконсервування сперми півнів та гусаків необхідно дотримуватись вимог щодо отримання та підготовки сперми до заморожування, охолодження до -196°C , зберігання в рідкому азоті та розморожування. Саме коректне проведення технології низькотемпературного заморожування дозволить максимально уникнути кріопошкоджень структурних частин сперматозоїдів, а також зберегти їх цілісність і життєздатність на високому рівні.

Висновки

1. В результаті проведених досліджень модифіковано метод диференційованого фарбування структурних частин сперматозоїдів півнів та гусаків, який дозволяє досить швидко і точно оцінити морфо-функціональний стан статевих клітин до та після кріоконсервування.

2. Вдосконалений метод дозволив виявити та класифікувати основні пошкодження структурних частин сперматозоїдів, які виникають під час їх низькотемпературного консервування.

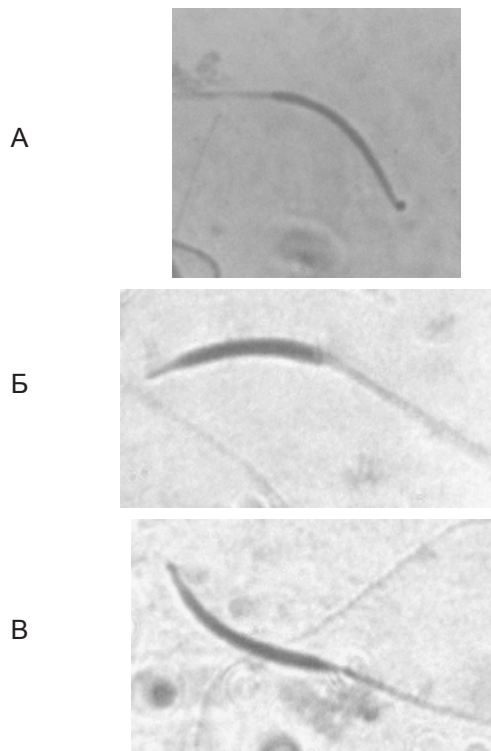


Рис. 1. Пошкодження акросом сперматозоїдів гусаків: кулеподібна акросома (А), видовжена акросома (Б), видовжена і потовщена на кінці акросома (В).

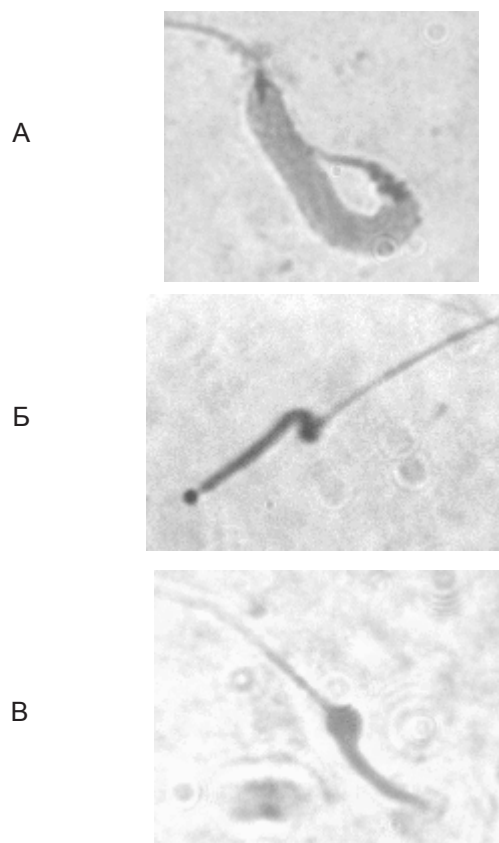


Рис. 2. Пошкодження голівок сперматозоїдів гусаків (А, В) та півнів (Б): роздута голівка (А), перегин в хвостовій частині голівки (Б), роздуття хвостової частини голівки (В).

Література

1. Белецкий Е., Сурай П. Оценка морфологического состояния спермиев // Птицеводство.– 1989.– №3.– С. 33.
2. Бичко С.В., Артеменко О.Б., Терещенко О.В., Ліннік Т.П. Кріоконсервування сперми гусаків у пластикових соломинках // Проблеми кріобіології.– 2004.– №4.– С.61-66.
3. Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. Кріоконсервирование клеточных суспензий // Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– К.: Наукова думка, 1983.– 240 с.
4. Сахацкий Н.И., Терещенко А.В., Артеменко А.Б. Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности заморожено-оттаяной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология.– 1987.– №12.– С.77-80.
5. Терещенко А.В. Сохранность сперматозоидов петухов в зависимости от условий криоконсервирования: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. - 1988. – 164с.
6. Bakst M.R., Cecil H.C., Sexton T.J. Modification of the ethidium bromide exclusion procedure for evaluation of turkey semen // Poultry Sci.– 1991.– Vol. 70.– P. 366-370.
7. Bilgili S.F., Renden J.A. Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration // Poultry Sci.– 1984.– Vol. 63.– P. 2275-2277.
8. Bilgili S.F., Sexton K.J., Renden J.A. Fluorometry of poultry semen: influence of dilution and storage on chicken spermatozoal viability and fertility // Poultry Sci.– 1987.– Vol. 66.– P. 2032-2035.
9. Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard J.P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo // Cryobiology.– 1999.– Vol. 39.– P. 185-191.
10. Donoghue A.M., Garner D.L., Donoghue D.J., Johnson L.A. Assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey semen using of combination of hypoosmotic stress, fluorescent stain and flow cytometry // Theriogenology.– 1996.– Vol. 46.– P. 153-163.
11. Donoghue A.M., Garner D.L., Donoghue D.J., Johnson L.A. Viability assesment of turkey sperm fluorescent staining and flow cytometry // Poultry Sci.– 1995.– Vol. 74.– P. 1191-1200.
12. Fiser P.S., Fairful R.W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa // Cryobiology.– 1989.– Vol. 26.– P. 64-69.
13. Hammerstedt R.H., Graham J.K. Cryopreservation of poultry semen: the enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29.– P. 26-38.
14. Kuroki M., Mori M. Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor // Poultry Sci.– 1997.– Vol. 76.– P.748-752.
15. Maeda T., Terada T. Morphological observations on the fowl spermatozoa stored in freezing or liquid state // Japanese Poultry Sci.– 1982.– Vol. 19, N6.– P. 315-321.
16. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. Studies of factors causing abnormal acrosomes and crook-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing // British Poultry Sci.– 1986.– Vol. 27, N4. – P. 695-702.
17. Marquez B.J., Ogasawara G.X. Scanning electron microscope studies of turkey semen // Poultry Sc.– 1975.– Vol. 54.– P.1139-1143.
18. Wishart G.J., Stains H.J., Hazary R.C. Evaluation of fertility: biological basis and practical application // World's Poultry Sci. J.– 2001.– Vol. 57, N3.– P. 309-314.
19. Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals: Mechanism and control of animal fertilization.– Academic Press, 1983.– P. 81-182.

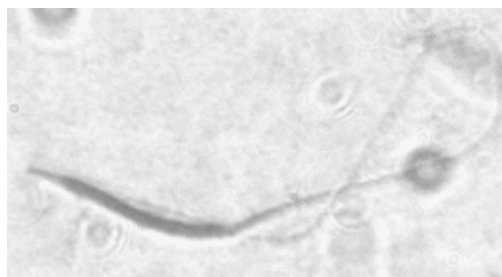


Рис. 3. Сперматозоїд гусака з петлеподібно закрученим хвостом.