УДК 636.2.082.453.5

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ СЕКСИНГЕ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦА

Рецензенты: д.-тор б.наук, проф., академик НААН Осташко Ф.И.; н.с. Лисин В.И.

А.Б. Сушко, О.А. Чернецов
Институт животноводства НААН

В процессе сексинга на проточном сортере MoFlo-SX разбавленная сперма жеребца подвергается давлению около 3 атм. с последующей пульверизацией на поток отдельных спермиев. При выходе из капилляра происходит резкое падение давления, вызывающее гидродинамический удар. На цитометре Dako Galaxy по окрашиванию пропидиумом йодидом и красителем SYBR-14 была исследована целостность мембран сексированной и несексированной спермы жеребца после криоконсервации. Полученные результаты показали почти двукратное снижение основных физиологических показателей спермы жеребца после ее сексирования и криоконсервации в сравнении с несексированной спермой. Фортификация мембран спермиев для лучшей переносимости процесса сексинга требует дальнейших исследований состава сред-разбавителей как для сортинга, так и для криоконсервации сексированной спермы.

Ключевые слова: **сексинг спермы, мембрана спермия, разбавитель спермы, сортер MoFlo-SX, проточная цитометрия**

В 1998 г. компания XY Inc. (США) получила первого в мире жеребенка после осеменения сексированной спермой. В 2010 г. для конезаводчиков совместно двумя компаниями Sexing Technologies и Equine Reproduction Innovations предложена новая услуга по оплодотворению ооцитов лошади сексированной спермой.

Современные проточные флуорометрические сортеры позволяют разделять сперму с.-х. животных на X- и Y-фракции с точностью до 97 % для последующего получения потомства определенного пола [1-4]. Спермии, несущие X-хромосому, например, у жеребца содержат ДНК на 3,7 % больше, чем Y- спермии, что позволяет получать сексированную сперму [5]. На первом этапе сексирования спермии окрашивают витальным флуоресцентным ДНК-красителем Hoechst 33342, при этом количество красителя, связавшегося с ДНК спермия должно достичь эквимолярного соотношения с этой ДНК. Затем по силе свечения красителя Hoechst 33342 детектор сортера определяет наличие в спермии X или Y хромосомы со скоростью 12…15 млн. клеток в час. Стандартный метод окрашивания спермы для сексинга при 35 ºС длится 40-60 минут [7]. При этом желточные разбавители не используются, так как препятствуют окрашиванию. Далее, перед заправкой сортера сперма разбавляется в соотношении 1:1 средой с 2 % желтка. Таким образом, конечная концентрация желтка в момент сортинга недостаточна для усиления

(фортификации) плазматических мембран спермиев фосфолипидами и липопротеинами желтка. В результате сперма в полной мере незащищена от гидродинамического удара, который происходит при последующем сортинге.

Поэтому в настоящее время изучаются факторы, влияющие на мембрану и клеточные органеллы спермиев при сортинге. На сперме жеребца и быка было показано, что снижение давления при сортинге с 3,5 атм. до 2,8 атм. улучшает качество сексированной спермы, незначительно снижая скорость сортинга [8]. Проведено исследование влияния процесса сортинга на целостность клеточных мембран, акросомы, митохондрий спермиев жеребца; показано, что, несмотря на снижение подвижности клеток, сексинг не вредил митохондриальной активности и жизнеспособности спермы жеребца сразу после оттаивания [9]. Кроме того, стандартный метод окрашивания спермы красителем Hoechst 33342 проходит в среде Z-fluid, содержащей 0,3% BSA без фосфолипидов и липопротеинов, что по нашему мнению недостаточно для фортификации мембран.

Целью настоящей работы было исследование влияния сексинга спермы жеребца и последующей криоконсервации на мембранную проницаемость спермиев.

Материалы и методы исследований. Работа была проведена на сперме жеребца в Институте Зоотехники (Балице, Польша). Сперму получали на изотермическую вагину конструкции Института животноводства НААН [6].

В опыте перед сортингом сперму окрашивали красителем Hoechst 33342 по методу Л. Джонсон и др. [7] с изменениями согласно новому методу XY Inc. При этом концентрация маточного раствора красителя Hoechst 33342 оставалась как в работе [7], но прибавляли краситель в количестве 15 мкл на 200 млн. спермиев в 1 мл раствора Z-fluid при pH 7,45 и осмотическом давлении 300 +/-5 мОсм. Окрашивание длилось 40 минут при 35 ^{o}C. После окрашивания сперму дополнительно разбавляли средой Z-fluid, содержащей 2 % желтка до концентрации 100 млн. сперматозоидов в 1 мл. Сепарацию на X-,Y-фракции окрашенной спермы проводили на проточном сортере цитофлуорометре MoFlo SX (Dako Cytomation). В контроле окрашивание спермы красителем Hoechst 33342 и сепарацию на X-,Y-фракции не проводили.

Криоконсервирование спермы в контроле и опыте проводилось в устройстве „Криотроп”, разработанном нами [10]. В “Криотропе” реализовывали двухскоростной режим охлаждения спермы (от 0 ^{o}C до минус 10 ^{o}C со скоростью 15-16 ^{o}C/мин; от минус 10 ^{o}C до минус 80 ^{o}C со скоростью 111-115 ^{o}C/мин с использованием пайет). Сперму замораживали после процедуры отмывания от секретов добавочных половых желез (геля) и отделения плазмы путем центрифугирования при g=800, после разбавления и доведения концентрации до 100 млн. спермиев/мл. Разбавление и замораживание сексированной спермы проводили с использованием среды SMEY с добавлением 2 % глицерина.

Перед замораживанием сексированной спермы была изучена эффективность разных базовых буферных сред для криоконсервирования спермы жеребца: среда SMEY с добавлением 2 % глицерина по рецепту [11]; среда КМТ – комбинация сред Кеннея (Kenney) и Тироде (Tyrode) (в соотношении 65 % и 35 %) с добавлением 2 % глицерина по рецепту [12] и среда ЛХЦЖ (лакозо-хелато-цитратно-желточная для хранения спермы жеребцов, ГОСТ 24163-80) с добавлением 3,5 % глицерина. Среды отличались по составу сахаров, солей и природных антишоковых компонентов.

Степень повреждения мембран спермиев измеряли на цитометре Dako Galaxy по окрашиванию пропидиумом йодидом и красителем SYBR-14 (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Inc.). Длина волны света возбуждения флуоресценции 488 нм. В каждом измерении анализировали 25 тысяч спермиев. Результаты измерений фиксировали и обрабатывали с использованием компьютерных программ Flomax (Partex) и Summit (Cytomation).

Результаты исследований. Среди испытанных сред-разбавителей наибольшую криопротекторную эффективность показал SMEY. Принципиальные различия состава трех наиболее распространенных сред состоят в следующем: SMEY, в отличии от двух других сред, имела в своем составе: два антишоковых компонента – обезжиренное молоко и желток куриного яйца; комплекс моно- , ди- , три-сахаров (глюкозу, лактозу, рафинозу); два цитратных буфера – соли лимонной кислоты натрия и калия. КМТ содержала только молоко, в качестве компонента, защищающего от температурного шока, ряд солей (хлориды, фосфаты) и только один сахар (глюкозу). Среда ЛХЦЖ содержала только желток в качестве протектора, предупреждающего температурный шок, один сахар (лактозу), только один цитратный буфер (натрий лимоннокислый). Учитывая, что во всех трех средах, использовался традиционный криопротектор – глицерин, можно предположить, что различный качественный уровень спермы после замораживания-оттаивания объясняется более комплексной рецептурой, характерной для SMEY. Результаты замораживания спермы жеребца показаны в табл. 1.

В табл. 2 показаны результаты замораживания сексированной и контрольной спермы в среде SMEY. Полученные результаты указывают на значительное снижение криорезистентности спермиев после процедуры сексирования. Так, в нашем случае подвижность снизилась с 55,0 % до 33,0 %; выживаемость с 5 часов до 2,33. По степени повреждения мембран спермии, подвергнутые процедуре сексинга, также имели значительно более низкие показатели, а именно 18,79 % были отнесены к категории «живые», 5 % к категории «поврежденные» и 75,81 % к категории «мертвые». Эти показатели для спермы, замороженной непосредственно после обычной технологической обработки, соответствовали 33,95 %, 23 % и 42 % (табл.2).

Таким образом, наблюдалось почти двукратное снижение основных физиологических показателей спермы жеребца после ее сексирования.

1. Физиологические показатели и степень повреждения мембран спермиев жеребца в зависимости от использованной криопротекторной среды (M±m)

в процентах

Среда для замораживания спермы жеребца		Подвижность	Выживаемость при Т=37 °С, часов	Степень повреждения мембран спермиев ($n_{кл}$=25000 ×$n_э$)		
				живые	поврежденные	мертвые
		a	*b*	*c*	*d*	*e*
SMEY+2% глицерина $n_э$=14	*1*	52,86±2,44	5,00±0,28	30,95±1,58	15,53±1,27	53,50±2,07
КМТ+2% глицерина $n_э$=5	*2*	37,00±3,39	4,20±0,58	17,59±2,99	14,44±1,76	67,93±4,28
ЛХЦЖ+3, 5% глицерина $n_э$=5	*3*	19,00±3,32	2,20±0,49	14,87±3,19	7,56±1,00	77,58±3,34

Примечание: 1. $n_э$ - количество изученных эякулятов в опыте;

2. $n_{кл}$ - количество оцененных клеток (спермиев);

3. Достоверно различны при P<0,95: 1a и 2a, 1a и 3a, 2a и 3a, 1b и 3b, 1c и 2c, 1c и 3c, 1d и 3d, 2d и 3d, 1e и 2e, 1e и 3e.

2. Криорезистентность спермы жеребца после процедуры сексинга (M±m)

в процентах

Тип обработки спермы жеребца перед замораживанием	Подвижность	Выживаемость при 37 °С, часы	Классы спермиев в образце		
			живые	поврежденные	мертвые
Сексированние n=3	33,33±1,67	2,33±0,33	18,79±3,46	5,40±0,23	75,81±3,30
Без сексирования n=3	55,00±7,64	5,00±0,58	33,95±5,36	23,45±6,07	42,60±3,46

Примечание. Разница между сексированной и контрольной спермой достоверна (p<0,01).

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что при сексинге спермы жеребца, с целью уменьшения повреждения мембран спермиев, необходимы дальнейшие модификации процесса сортинга клеток и разработка новых сред-разбавителей. Подобные работы были проведены нами на сперме быка [13-14].

Мы благодарим профессора З. Сморонга и доктора М. Бохенека из Института Зоотехники (Балице, Польша) за предоставленное оборудование и полезные методические советы.

Выводы:

1. В процессе сексинга и криоконсервации спермы жеребца происходило снижение репродуктивных показателей половых клеток. В нашем случае подвижность снизилась с 55,0 % до 33,0 %; выживаемость с 5 часов до 2,33. После сексирования 18,79 % спермиев были отнесены к категории «живые», 5 % к категории «поврежденные» и 75,81 % к категории «мертвые». Эти показатели для спермы, замороженной непосредственно после обычной технологической обработки, соответствовали 33,95 %, 23 % и 42 %.
2. При сексинге спермы жеребца на этапе сортинга спермии подвергаются гидродинамическому удару из-за резкого падения давления. С целью уменьшения повреждения мембран спермиев необходимы дальнейшие модификации как процесса сортинга клеток, так и разработка новых сред-разбавителей, фортифицирующих мембраны спермиев, но не оказывающих влияния на чистоту сепарации X-,Y-фракций спермиев.

Библиографический список

1. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. - К.: Аграрна наука, 1995. – 183 с.
2. Seidel G.E. Sexing mammalian sperm – overview / Seidel G.E., Johnson L.A. // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1267-1272.
3. Seidel G.E. Current status of sexing mammalian spermatozoa / Seidel G.E., Garner Jr. // Reproduction. – 2002. – V. 124. – P. 733–743.
4. Hamano K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa / Hamano K. // J. Reprod. Dev. – 2007. – V. 53. – P. 27 – 38.
5. Johnson L.A. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations / Johnson L.A., Flook J.P., Look M.V., Pinkel D. // Gamete Res. – 1987. – V 16. – P. 1-9.
6. Пат. 31026 від 25.03.2008 Пристрій для отримання сперми жеребців. Сушко О.Б. Новиков О.О. – u200711907; заявка від 29.10.2007, UA31026U, Бюл. №6. - 8 с.
7. Johnson L.A. Sex preselection: high speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency / Johnson L.A., Welch G.R. // Theriogenology. – 1999. – V. 52. – P. 1323-1341.
8. Suh T.K. High pressure flow cytometric sorting damages sperm / Suh T.K., Schenk J.L., Seidel G.E. Jr. // Theriogenology.– 2005 - V 64(5), - P. 1035-48.
9. Quality and fertilizing ability in vivo of sex-sorted stallion spermatozoa / Mari G., Rizzato G., Merlo B. [et all] // Reprod. Domest. Anim. – 2010. – V. 45 (2). – P. 331-335.

10.Ушкодження мембран сперміїв жеребця при різних методах кріоконсервації / О.Б. Сушко, З. Сморанг, М. Бохенек [та ін.] // Науково-технічний бюлетень, № 102 / ІТ УААН. – Х. – 2010. – С. 147 – 152.

11.Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours frozen / Backman T., Bruemmer J.E., Graham J.K. [et all] // J. Anim. Sci. – 2004. – V. 82. – P. 690 – 694.

12.Padilla A.W. Extender and centrifugation effects on the motility patterens of slow-cooled stallion spermatozoa / Padilla A.W., Foote R.H. // J. Anim. Sci. – 1991. – V. 69. – P. 3308 – 3313.

13.Чернецов О.А. Сексинг спермы, современное состояние и модификации метода / Чернецов О.А. // Науково-технічний бюллетень. № 102 / ІТ УААН. – Х., 2010. – С. 187 – 194.

14.Чернецов О.А. Сексинг спермы быка в соевом разбавителе / Чернецов О.А., Павленко Б.М., Мирось В.В. // Науково-технічний бюллетень. № 100 / ІТ УААН. – Х., 2009. – С. 500 – 504.

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ УШКОДЖЕНЬ ПІД ЧАС СЕКСИНГУ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦЯ

Сушко О.Б., Чернецов О.А., Інститут тваринництва НААН

Під час сексингу на проточному сортері MoFlo-SX розбавлена сперма жеребця піддається тиску біля 3 атм. з наступною пульверизацією на потік окремих клітин. На виході з капіляра виника різьке падіння тиску, що спричиняє гідродинамічний удар. На цитометрі Dako Galaxy по фарбуванню пропідіумом йодидом та SYBR-14 була досліджена цілісність мембран сексованної та несексованої сперми жеребця після кріоконсервації. Отримані результати показали майже двократне зниження основних фізіологічних показників сперми жеребця після сексування і кріоконсервації у порівнянні з несексованною спермою. Фортифікація мембран сперміїв для кращого проходження процесу сексингу потребує подальших досліджень складу розбавників як для сортингу так і для кріоконсервації сексованої сперми.

Ключові слова: сексинг сперми, мембрана сперматозоїда, розбавник сперми, сортер MoFlo-SX, проточна цитометрія.

RESEARCH OF MEMBRANE DAMAGES AT STALLION SPERM SEXING

Sushko A.B., Chernetsov O.A.; IAS NAAS

At sexing process on flow sorter MoFlo-SX the diluted stallion sperm is exposed to pressure near 3 atm. with the subsequent spraying into a stream of separate cells. At an exit from a capillary there is the sharp pressure reduction, it causing hydrodynamic shock. In Dako Galaxy cytometer after cryopreservation by PI and SYBR-14 coloring the membrane integrity of sexing and nonsexing stallion sperms has been investigated. The received results have shown almost double decrease of the basic physiological parameters of stallion sperm after sperm sexing and cryopreservation in comparison nonsexing sperm. Fortification of sperm

membranes for the best cell hardness in sexing process demands the further researches of sperm extender both for sorting and for cryopreservation of sexing sperm.

Keywords: a sperm sexing, a sperm membrane, a sperm extender, MoFlo SX sorter, flow cytometry.

MEMBRANE DAMAGES INVESTIGATION BY STALLION SPERM SEXING

Sushko O., Chernetsov O.; Institute of animal science, NAASU

This article highlights the experimental research results on membrane damages during stallion sperm sexing. The diluted stallion semen is exposed to 3 atmosphere pressure during sexing on MoFlo-8X flow sorter. Subsequent pulverization is fulfilled on the separate spermatozoa flow. Gross pressure decrease is observed by capillary outlet and it results in hydrodynamic shock. Sexed and non-sexed stallion sperm membrane integrity after freezing preservation was investigated on DaKo Galaxy cyto-meter. Semen was tinged in propidium iodide and SYBR-14 dye. 2-fold reduction of the basal physiological stallion sperm parameters was observed after sexing and freezing preservation in comparison with non-sexed semen. Spermatozoa membrane consolidation expected to be executed for improved resistance to sexing procedure. Dilutor media composition investigation expedient to be fulfilled both for sorting and freezing preservation of sexed semen.

Key words: semen, sorting, spermatozoon membrane, semen dilutor, MoFlo-8X sorter, flow cyto-metric procedure.