

И. Ш. Шапиев, Д. А. Буханцева, Л. Г. Мороз

Влияние сверхмалых концентраций 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на устойчивость сперматозоидов при осмотическом и холодовом шоке

Аннотация. В целях поиска способов повышающих устойчивость сперматозоидов к криоконсервации исследовали влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на живучесть сперматозоидов в условиях холодового и осмотического шока. Показано что 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота в концентрации 10–13 мМол/л повышает живучесть сперматозоидов.

Ключевые слова: сперматозоиды быков, 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота, шок осмотический, холодовой, приживаемость.

Авторы:

Шапиев Исмаил Шапиевич — доктор с.-х. наук, зав. отдела воспроизводства с.-х. животных, ВНИИГРЖ, тел.: +7 (921) 655-62-47;

Буханцева Дарина Алексеевна — аспирант отдела воспроизводства, ВНИИГРЖ;

Мороз Людмила Григорьевна — кандидат биологических наук, отдел воспроизводства, ВНИИГРЖ.

Введение. Несмотря на достигнутые успехи в области криоконсервации сперматозоидов сельскохозяйственных животных после замораживания спермы быков 40–50% клеток погибает. Поэтому поиск способов, повышающих устойчивость сперматозоидов к замораживанию, остается актуальной проблемой [1, 2, 3, 4]. Одним из подходов, направленных на повышение сохранности сперматозоидов после криоконсервации спермы является поиск веществ, увеличивающих устойчивость сперматозоидов к замораживанию. В этом отношении представляют интерес исследования по изучению влияния малых и сверхмалых концентраций биологически активных веществ на неспецифическую резистентность клеток, тканей и организмов [5]. Из факторов, влияющих на выживаемость сперматозоидов при криоконсервации, выделяются: устойчивость сперматозоидов к «холодовому шоку» и изменениям осмотического давления, возникающих при разбавлении и замораживании-оттаивании спермы. Известно, что производные дибазола могут повышать устойчивость клеток к повреждающему воздействию различных факторов в низких концентрациях [6, 7, 8]. Ранее было показано [9], что 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная кислота при добавлении в среду для разбавления спермы в концентрации 10⁻¹³ Моля увеличивает живучесть сперматозоидов. Представляется интересным действие веществ этого класса сверхмалых концентрациях на устойчивость сперматозоидов при разбавлении спермы в средах с разной осмолярностью.

Цель исследований. Исследовать влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концент-

рации 10⁻¹³ Моля на устойчивость сперматозоидов быков при разбавлении спермы с разной осмолярностью и при холодовом шоке.

Материал и методы. Материалом исследования служила сперма быков ФГУП «Невское» с исходной активностью от 5 до 7 баллов, т.е. не допущенную к замораживанию для производственных целей по исходной активности. Использовали метод разделенного эякулята. Состав основной среды для разбавления спермы: лактоза 11,5 г, дистиллированная вода 100 мг, при осмолярности 336 мМол/л. Осмолярность среды изменяли в пределах 246...366 мМол/л за счет изменения концентрации лактозы.

В опытных вариантах в среду дополнительно вносили 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусную кислоту в концентрации 10⁻¹³Моля. Процент подвижных клеток, после разбавления, оценивался сразу, через час и через два часа после хранения при температуре 40⁰С. Холодовой шок сперматозоидов вызывали снижением температуры разбавленной спермы от 20⁰С до +4⁰С в течение 2 мин. Оценку состояния сперматозоидов проводили методом фазово-контрастной микроскопии.

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов изучали влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрации на сохранность сперматозоидов быков при разном осмотическом давлении. Как видно из таблицы 1 сразу после разбавления спермы средой с более низким или высоким осмотическим давлением, относительно среды с осмолярностью 336 мМоль/л (изотоничной для спермы быка), наблюдается резкое снижение

подвижности сперматозоидов. При этом количество подвижных клеток в гипотонической и гипертонической средах с 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой больше чем в средах без 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты.

Уменьшение, или увеличение осмолярности среды относительно базовой (336 мМоль/л) на 30 мМоль/л, приводит к уменьшению доли подвижных клеток на 32–36% среде с без 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой. В среде с 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислотой доля подвижных клеток уменьшается на 18–20%.

При разбавлении спермы при температуре 20⁰С в среде с осмолярностью 336 мМоль/л с добавлением 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты (опыт) и без добавления (контроль) различия в активности спермы не различается. Однако через час и через два часа после хранения при температуре 40⁰С в опыте подвижность сперматозоидов соответственно на 12 и 15% выше, чем в контроле.

В гипоосмотических условиях через час после хранения разбавленной спермы в контроле наблюдается полная гибель сперматозоидов, а в опыте наблюдается сохранение подвижности у 6–12% клеток. В гиперосмотических условиях, через час,

в опыте по сравнению контролем, выше процент подвижности и составляет 14±1,6%.

Исследование сохранности акросомы и жгутика сперматозоидов, не выявило достоверных различий по влиянию 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты отношению к контролю во всех вариантах (таблица 2). Выявлено только влияние осмолярности среды на морфологическую структуру клеток.

В следующей серии опытов исследовали влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на устойчивость сперматозоидов быков к холодовому шоку (таблица 3). Как видно, в контрольной среде после холодового шока 40% сперматозоидов от их исходного количества потеряли поступательную двигательную активность, в то время как в опытной среде потеряли поступательную подвижность 26% клеток.

Сопоставляя данные результатов опытов по влиянию 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на переживаемость сперматозоидов и их морфологию при осмотическом и холодовом шоке можно предположить, что исследуемое вещество не оказывает наблюдаемое фазово-контрастной микроскопией защитного действия на сохранность

Таблица 1. Влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрации 10⁻¹³ Моля на сохранность сперматозоидов быков при разном осмотическом давлении (n=11)

Осмолярность, мМоль/L	Процент подвижных клеток после разбавления спермы					
	Сразу после разбавления		через час		через 2 часа	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
366	28±4,8 ^a	42±5,8 ^a	10±0,9 ^g	14±1,6 ^g	0	0
336	60±3,2 ^A	60±3,2 ^B	29±3,7 ^d	41±3,3 ^d	11±2,4	26±3,0
306	24±2,4 ^b	40±4,4 ^b	11±1,6 ^e	19±2,7 ^e	0	6±1,6
276	15±2,2 ^c	31±4,0 ^c	0	12±1,5	0	0
246	4±2,4 [*]	20±3,2 [*]	0	6±1,8	0	0

aa; bb; cc; dd; ee; ii; Aa; Ab; Bb; Ba P<0,01; gg P<0,05

Таблица 2. Влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрации 10⁻¹⁵ на морфологию сперматозоидов при разном осмотическом давлении (n=11).

Осмолярность, мМоль/L	Вариант	Нормальные, %	Набухшие аросомы, %	Свободные головки, %	Повреждение жгутика, %	Отпавший колпачек, %
365	опыт	44,5±1,4	11,2±1,5	3,0±0,5	24,9±0,8	15,0±0,5
	контроль	40,7±0,8	11,8±1,3	3,1±0,6	26,6±1,2	16,5±0,8
336	опыт	83,6±1,2	2,4±0,6	1,4±0,5	9,0±0,4	1,9±0,5
	контроль	83,3±1,2	2,4±0,5	1,6±0,5	9,1±0,4	2,0±0,5
307	опыт	37,8±1,6	14,7±1,1	2,5±0,6	30,5±1,6	13,0±1,4
	контроль	35,5±1,6	15,6±1,0	2,6±0,7	31,1±1,3	13,6±1,4
277	опыт	33,7±2,0	15,4±0,9	3,6±0,6	32,0±1,9	13,9±1,4
	контроль	31,4±1,8	15,8±0,9	3,7±0,6	33,0±1,7	14,4±1,5
248	опыт	30,3±2,1	16,4±1,0	5,0±0,8	31,8±1,7	15,1±1,3
	контроль	28,2±1,9	16,6±0,6	5,3±0,9	33,6±1,5	14,8±0,8

Таблица 3. Влияние 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты в концентрации 10^{-13} моля на устойчивость сперматозоидов к холодному шоку (n=11)

Вариант	Процент поступательно подвижных клеток	
	До холодного шока	После холодного шока
Контроль	59± 2,8	19± 3,1
Опыт	59± 3,5	33± 1,5*

акросомного чехлика и хвоста сперматозоидов. Наблюдаемые внешние морфологические изменения связаны с резким изменением осмотического давления среды — гипертонией или гипотонией. При этом и при изменении осмолярности при разбавлении спермы средой и при холодном шоке

2-бензимидазол-1-ил-1-уксусная-кислота повышает переживаемость сперматозоидов при температуре 40°C . Можно предположить, наблюдаемое явление скорее связано с защитным действием 2-бензимидазол-1-ил-1-уксусной кислоты на мембранные структуры митохондрий сперматозоидов.

Литература

1. Chaveiro A., Liu J., Mullen S., Woelders H. & Critser J. K. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore // *Cryobiology* 2004. № 48. pp. 72–80.
2. Chaveiro A., Machado L., Frijters A., Engel B., Woelders H.. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports // *Theriogenology* 2006. vol. 65, n. 9. pp. 1875–1890.
3. Amirat-Briand L., Bencharif D., Vera-Munoz O., Bel Hadj Ali H., Destrumelle S., Desherces S., Schmidt E., Anton M., Tainturier D. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results // *Theriogenology*. — 2009. Vol. 71, 8. p. 1209–121.
4. Gilmore J. A., Liu J., Gao D. Y., Critser Y. K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997. — 1: 112–118.
5. Бурлакова Е. Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // *Российский химический журнал*, 1999. т. XLIII, № 5, с. 3–11.
6. Сидоров О. А. Влияние дибазола на время переживания сперматозоидов // *Материалы научного совещания по вопросам фариокологической регуляции клеточной резистентности*. — 1963 — с. 18–20.
7. Андреева Е. Н. Влияние дибазола, а также некоторых стимуляторов и ингибиторов белкового синтеза на теплоустойчивость поргняжной мышцы лягушки. // *Синтез белка и резистентность клеток*, Л., 1971. — с. 36–45.
8. Шапиев И. Ш., Мороз Л. Г., Коваленко Г. П. Влияние синтетических антиоксидантов и производных бензимидазола на оплодотворяемость свиноматок // *Бюлл. ВНИИГРЖ*. — в. 128. — 1991. с. 5–7.
9. Буханцева Д. А., Харитонов С. А. Влияние производных бензимидазола на переживаемость сперматозоидов быков // *Матер. конференции «Генетика и селекция в животноводстве» СПб-Пушкин*. — 2011. — с. 184–187

Shapiev I. Sh., Buhantseva D. A., Moroz L. G.

Influence of ultra low 2-benzimidazol-1-yl-1-acetic acid concentrations on spermatozoa survival ability in osmotic and cold shock

Abstract. Influence of 2-benzimidazole-1-yl-acetic acid on survival ability of cryopreserved sperm in cold and osmotic shock was studied. It was shown that 2-benzimidazol-1-yl-1-acetic acid in concentration of 10^{-13} mMol / L increases the vitality of spermatozoa.

Keywords: bull sperm, 2-benzimidazole-1-yl-1-acetic acid, osmotic and cold shock, survival ability.

Authors:

Shapiev Ismail Shapieovich — Dr. agric. Sci., Laboratory of Animal Reproduction, Russian research institute of farm animal genetics and breeding, tel. 7(921) 655-62-47

Buhantseva Darina Alekseevna — post Graduate Student, Junior Researcher of Laboratory of Animal Reproduction, Russian research institute of farm animal genetics and breeding.

Moroz Ludmila Grigorjevna — candidate of Biological Sciences, Laboratory of Animal Reproduction, Russian research institute of farm animal genetics and breeding.