



Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»



Всероссийская научно-практическая конференция «Генетические ресурсы животноводства и растениеводства: состояние и перспективы в сфере сельского хозяйства» 3-4 ноября Махачкала, 2022

Оксидативный стресс и жизнеспособность сперматозоидов петухов.



Докладчик - Плешанов Н. В.
научный сотрудник лаборатории генетики,
разведения и сохранения генетических
ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ.

Исследование выполнено в рамках ГЗ № 121052600357-8

Махачкала
2022

Активные формы кислорода (АФК) – это свободные радикалы, производные кислорода, которые в умеренных количествах выполняют ряд важных функций в реализации биохимических процессов, необходимых для механизмов капацитации и акросомной реакции.

Однако, чрезмерная генерация АФК приводит к оксидативному стрессу, повреждению компонентов клеточной стенки и органелл сперматозоидов, особенно липидных, белковых молекул, ДНК и нарушению работы митохондрий.

Сперматозоиды птиц характеризуются низкой концентрацией цитоплазматических антиоксидантов и повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот в их фосфолипидах. В результате данной особенности мужские гаметы птиц более восприимчивы к перекисному окислению липидов.

При этом одним из известных триггеров оксидативного стресса является процесс замораживания и оттаивания, когда значительное воздействие оказывается на мембраны клеток.

Цель исследования

Изучение влияния уровня активных форм кислорода в нативных сперматозоидах петухов на качественные показатели свежеразбавленных и деконсервированных индивидуальных эякулятов:

- подвижность;
- повреждение клеточных мембран спермиев (жизнеспособность).

Материалы и методы

Опыт проводился на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Объектом исследования являлись петухи породы род-айланд красный (n= 20) в возрасте 44 недели жизни.

Сперму получали в пенициллиновые флаконы, объемом 10 мл, при помощи метода абдоминального массажа (Burrows and Quinn 1935).

Объем каждого индивидуального эякулята измерялся градуированными пипетками и делился на две равные аликвоты, для внесения соответствующего разбавителя. В качестве среды для разбавления первой части эякулята использовали разбавитель ВНИИГРЖ , а для разбавления второй аликвоты и последующей криоконсервации – ЛКС-1, в соотношении 1:1.

Оценку подвижности сперматозоидов проводили с помощью системы визуальной микроскопии Axio Imager («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия).

Концентрацию спермы измеряли с помощью лабораторного фотометра Accuread Photometer (IMV Technologies, Великобритания).

Криоконсервация производилась в гранулах, путем прямого накапывания семени в жидкий азот.

В качестве криопротектора использовали - N,N-Диметилацетамид (DMA) в количестве, соответствующем конечной концентрации - 6%.

Оттаивание гранул проводилось при t 60°C в щелевом оттаивателе (оборудование разработки ВНИИГРЖ, 1989 год).

Поврежденность плазматических мембран сперматозоидов в нативном и деконсервированном семени оценивали при помощи метода суправитальной окраски по Блюму. Препараты просматривали при увеличении $\times 1000$ с масляной иммерсией. Сперматозоиды с поврежденными мембранами окрашивались в красный цвет, интактные клетки оставались белыми (бесцветными). В каждом препарате оценивалось не менее 200 клеток.

Для определения уровней генерации АФК в сперматозоидах петухов использовали метод, основанный на люминол-пероксидазной хемилюминесценции, которую измеряли на хемилюминометре Lum-1200 с программным обеспечением PowerGraph Professional 3.3 (ООО «ДИСофт», Россия). Методика, предложенная Aitken R.J et al. для определения количества АФК в сперматозоидах человека данным методом, была скорректирована с учетом видовых особенностей *Gallus gallus domesticus*. Так, время проведения каждого измерения составляло 3 часа, основываясь на кривой хемилюминесценции активных форм кислорода (учитывая рост показателя, пик и спад). Концентрация клеток (7×10^6 кл./мл) для проведения измерений подбиралась экспериментальным путем, по результатам серии предварительных экспериментов.

Таблица 1. Качественные показатели спермы петухов породы род-айланд красный до и после криоконсервации (n=20; M±m).

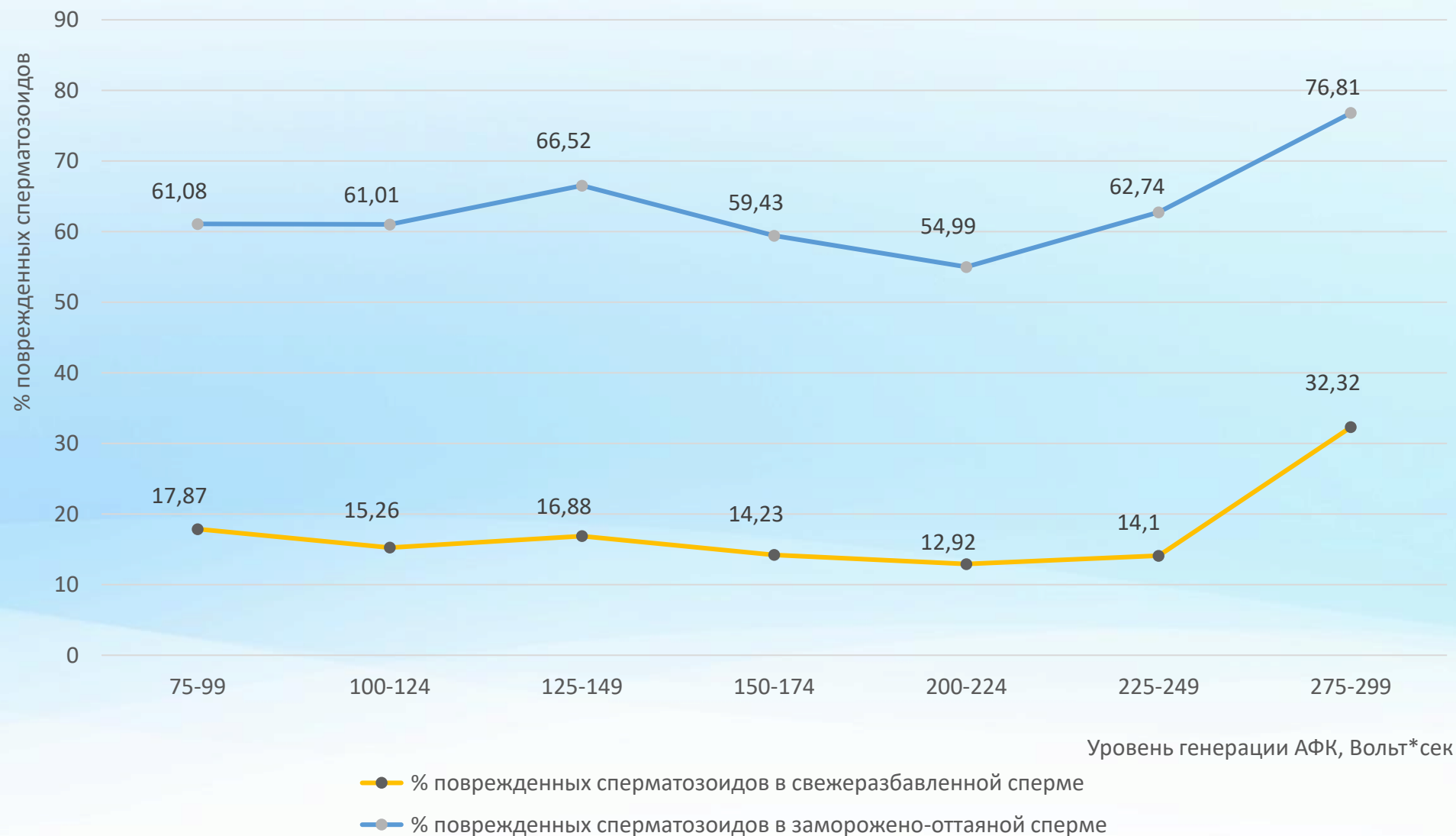
| Нативная сперма | | | | Заморожено-оттаянное семя | |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---|---------------------------|---|
| Средний объем, мл | Средняя подвижность, % | Средняя концентрация спермы, млрд/мл | Среднее количество клеток с поврежденной мембраной, % | Средняя подвижность, % | Среднее количество клеток с поврежденной мембраной, % |
| 0,55 ±0,05 | 81,81 ^a ± 1,91 | 3,20 ±0,13 | 17,19 ^b ± 1,64 | 35,73 ^c ±3,00 | 62,87 ^d ± 2,01 |
| Коэффициент вариации (Cv), % | | | | | |
| 40,96 | 10,16 | 18,32 | 41,58 | 36,60 | 13,91 |

Примечание: a, c: P < 0,001; b, d: P < 0,001

Рисунок 1. Общая подвижность сперматозоидов в нативной и деконсервированной сперме петухов в зависимости от уровня генерации АФК



Рисунок 2. Поврежденность мембран сперматозоидов в нативной и деконсервированной сперме петухов в зависимости от уровня генерации АФК.



Выводы

1. Впервые получены данные, основанные на методе люминол-пероксидазной хемилюминесценции по допустимому уровню АФК в нативных сперматозоидах петухов.
2. Диапазон допустимого значения общего уровня генерации АФК в нативных сперматозоидах петухов, не оказывающий негативного влияния на подвижность и жизнеспособность спермиев, составил от 75 до 249 Вольт*сек. В свою очередь, превышение порога 249 Вольт*сек ведет к снижению этих качественных показателей семени.
3. Использование общепринятых методик оценки индивидуальных эякулятов для последующей криоконсервации не гарантируют стабильных показателей фертильности. Поэтому необходимо применять дополнительные критерии оценки и отбора спермы. Метод люминол-пероксидажной хемилюминесценции позволяет расширить оценку нативной спермы петухов-производителей путем оценки уровня АФК с возможным прогнозированием фертильности для пополнения криобанков репродуктивных клеток.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



Исследования выполнены в соответствии с гос. заданием № 121052600357-8.