

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ АКРОСОМЫ СПЕРМАТОЗОИДА У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

*Борунова С.М., **Иолчиев Б.С., ***Абрамов П.Н., *Бадмаев О.Э.,
****Таджиева А.В., *Рибченко А.С.

*ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва, Россия

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», г. Москва, Россия

***ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва, Россия

****ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
г. Москва, Россия

Введение. В последние годы интенсивно развиваются биотехнологические методы исследования функциональных свойств сперматозоидов быков-производителей, определяющих их репродуктивный потенциал [1-8].

Достижения современной молекулярной биологии, цитологии и генетики дают возможность определить морфологический субстрат почти для каждой функции сперматозоида. В частности, по словам Е.Е. Брагиной, они дают понимание того, что морфология сперматозоидов является показателем их компетентности как в процессе собственно оплодотворения (проникновения сперматозоида в яйцеклетку), так и в процессе эмбриогенеза [9].

Сперматозоид – это уникальная высокоспециализированная клетка, основная функция которой заключается в переносе отцовского генома в яйцеклетку. Для выполнения этой функции сперматозоид морфологически разделен на 2 компартмента, необходимых для оплодотворения – головку и жгутик [10]. Головка, в свою очередь, разделена на акросомальный участок и ядро, содержащее гаплоидный набор хромосом. Собственно акросома представляет собой плоскую цистерну, плотно примыкающую к ядру и окруженную мембраной. Наружная акросомная мембрана окружена плазматической мембраной сперматозоида. Акросома – это секреторный пузырек, который формируется из пузырьков зоны аппарата Гольджи, начиная с ранних этапов спермиогенеза. Акросома расположена в виде «шапочки» на переднем полюсе ядра. В матриксе акросомы локализованы протеолитические ферменты, которые участвуют во взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки и обеспечивают проникновение через зону пеллюцида.

Между акросомной и ядерной оболочкой находится тонкий слой вещества – перинуклеарная зона. Именно в ней выявлен комплекс белков, которые считают фактором активации ооцитов. Их высвобождение из головки сперматозоида в цитоплазму ооцита ведет к активации ооцита, включая завершение мейоза и защиту от полиспермии. При акросомальной реакции спермии млекопитающих высвобождают протеазы и гиалуронидазу, которые играют важную роль в проникновении спермия через *zonapellucida* [11].

Выявление в эякуляте повышенного содержания сперматозоидов с аномальной акросомой – одна из причин идиопатического бесплодия сельскохозяйственных производителей, даже при нормативных параметрах спермограммы.

Из литературных данных известно, что акросома спермиев быка имеет менее плотную консистенцию, чем другие части спермия. Поэтому при хранении спермы дегенеративные изменения возникают в первую очередь в акросоме. По материалам некоторых авторов, процент аномальных акросом у быков наиболее низкий весной и летом, высокий – поздней осенью и зимой.

Отсутствие и повреждение акросомы у сперматозоида вызывается нарушением процесса сперматогенеза с генетической детерминации к данному заболеванию. Дегенерация акросомы выражается в разрушении плазматической мембраны,

что приводит к снижению фертилизационной способности эякулята с/х производителей.



Рисунок 1 – Строение сперматозоида

Для успешного оплодотворения маток с/х животных при искусственном их осеменении сперматозоиду необходимы:

1) моторный аппарат, с помощью которого он может преодолевать большое расстояние от влагалища до верхней трети яйцепровода, где происходит оплодотворение ооцита, при этом сперматозоид движется навстречу яйцеклетке против тока жидкости, преодолевая реотаксис;

2) наличие интактной акросомы, с помощью которой осуществляется пенетрация сперматозоидом оболочек ооцита;

3) собственно ядро сперматозоида для переноса в ооцит генетического материала отцовской гаметы;

4) центриоль зрелого сперматозоида, обеспечивающая митотическое деление и дробление эмбриона;

5) низкий процент или отсутствие фрагментированных участков ДНК.

Целью нашей научной работы явилось изучение морфофункциональных особенностей сперматозоидов быков-производителей, а именно проведение анализа такого параметра, как определение целостности акросомы сперматозоида крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Материалом исследования служила заморожено-оттаянная сперма и современные дифференциальные красители. Методы, используемые в работе, были общепринятыми для клинических исследований в репродуктологии.

Отделом по контролю качества и стандартизации генетического материала и препаратов, применяемых при воспроизводстве животных ФГБУ «ВГНКИ» совместно с сотрудниками ФБГУ «ВИЖ им. Л.К. Эрнста» были разработаны методические рекомендации по определению целостности акросомы сперматозоида по средствам тест-набора красителей Дифф-Квик.

Для оценки биологического профиля состояние акросомы сперматозоида в настоящее время используется ряд методик по ее окраске. методика окраски, указанная в ГОСТ № 32277 – 2013, а именно пункт 8.4 не отвечает современным требованиям определения целостности акросомы сперматозоида. Указанный в ГОСТе краситель эозин/нигрозин лучше всего использовать для определения количества мертвых и живых сперматозоидов, но не для дифференциации морфофункциональных характеристик изучаемого сперматозоида.

В работе было проведено сравнение дифференциального окрашивания сперматозоидов красителями эозин/нигрозин и Дифф-Квик.

Дифф-Квик – это современный набор реактивов, используемых для быстро-

го окрашивания биоматериала, широко используется в медицине для клинических исследований крови человека, мы впервые оптимизировали его для исследования спермы крупного рогатого скота и при этом было выявлено, что эффективность окрашивания красителями Дифф-Квик была выше окраски эозин/нигрозином, то есть мы можем подсчитать не только количество сперматозоидов с акросомой, но и при этом установить качество самой акросомы сперматозоидов в образце.

Результаты и обсуждение. Нами были отработаны этапы и условия пробоподготовки, время окрашивания и параметры оценки результатов (предложена форма расчета количества сперматозоидов с поврежденной акросомой сперматозоида в %).

Было показано, что сперматозоиды крупного рогатого скота с поврежденной акросомой при окрашивании красителями Дифф-Квик окрашиваются в светлорозовый цвет, в норме окрашиваются в коричневый.

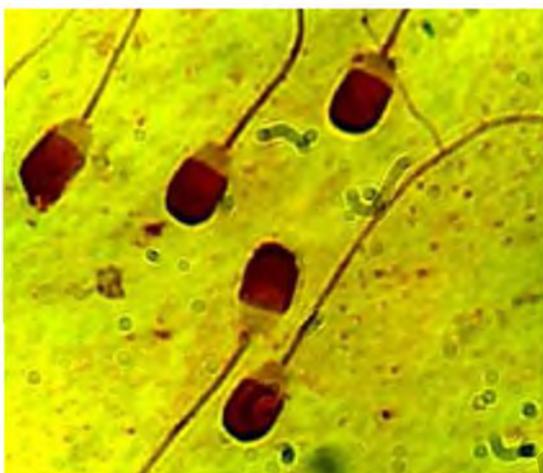


Рисунок 2 – Сперматозоид с целой акросомой

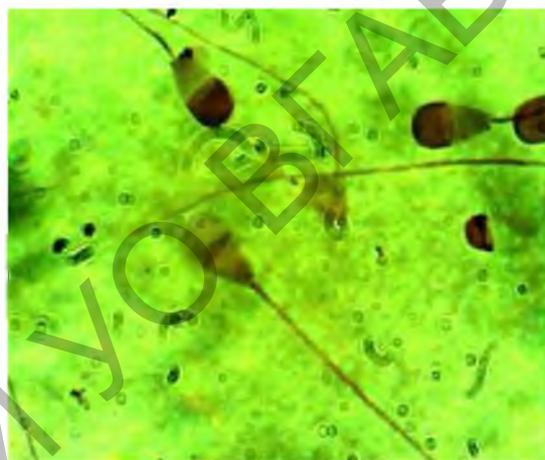


Рисунок 3 – Сперматозоид с поврежденной акросомой

В рамках выполнения одного из промежуточных этапов научно-исследовательской работы было исследовано 30 спермопроб быков-производителей в трехкратной повторности на определение целостности акросомы сперматозоидов. Средний показатель количества сперматозоидов с интактной акросомой составил 87%, что находится в пределах нормы по ГОСТ № 32277 – 2013 (не менее 60%).

Выводы. Предлагаемая нами методика с использованием тест набора Дифф-Квик позволяет получать результаты с высокой степенью достоверности и является более эффективной по сравнению с другими методами окраски акросомы сперматозоида животных-производителей.

Литература: 1. Багиров В.А., Иолчиев Б.С., Таджиева А.В., Кленовицкий П.М. Оценка репродуктивного потенциала производителей с помощью лабораторных исследований спермы // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук №1-2.2015. с.51-54. 2. Брагина Е. Е., Бочарова Е. Н. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия // Андрология и генитальная хирургия №1. - 2014. С 55-63. 3. Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, Н.А. Зиновьева, П.М. Кленовицкий, А.В. Таджиева, Н.Н. Сулима. Биологическая полноценность спермы и воспроизводство стада // «Молочное и мясное скотоводство». №8 2014. С. 6-8. 4. Кононов В.П., Черных В.Я. Биотехника репродукции в молочном скотоводстве. М., 2009, 365 с. 5. Кононов В.П., Мамбеталиев М.С. Оценка потенциала воспроизводительной способности быков. Зоотехния, 1994, № 7, с.27-29. 6. Таджиева А.В., Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Кленовицкий П.М., Сивкин Н.В. Изучение состояния наследственного материала в сперматозоидах быков-производителей. Интеграция науки и производства-основа эффективности сельского хозяйства / Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции (Самарканд, 21-22 ноября 2013 года) с. 77-80. 7. Хаят С.Ш., Брагина Е.Е., Курило Л.Ф. Ультроструктурное исследование сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией // Андрология и генитальная хирургия №4.- 2012.

с.54-61. 8. Чомаев А.М., Чернышова М.Н., Даровских В.Е., Афанасьев В.А. Анализ оплодотворяющей способности семени быков-производителей. Вестник Российского университета дружбы народов, серия: сельскохозяйственные науки, животноводство, 2003, №10, с. 46-48. 9. Bochenek M., Smorag Z. The level of sperm DNA fragmentation in bulls of different breeds // Ann. Anim. Sci., Vol. 10, No. 4 (2010) 379–384. 10. Kastelic, J.P., and J. Thundathil. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 2008. 43(Suppl. 2):368–373. 11. Ramalho-Santos J., Schatten G., Moreno R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *BiolReprod* 2002;67(4):1043–51.

УДК 619:579.62:616-084:614.48

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ ПРИ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ

Блохин А.А., Исаев В.В., Бурова О.А., Коробова О.В., Хрисанфова Т.Д.
ФГБНУ «Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны Российской Федерации», г. Нижний Новгород, Россия

Введение. Одной из основных задач ветеринарной медицины является забота о росте и сохранности поголовья высокопродуктивных сельскохозяйственных животных. Эту задачу помогает решить система ветеринарно-профилактических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости и падежа скота, где ключевым методом является дезинфекция.

В течение эволюции животные и микроорганизмы были и остаются неразрывно связанными трофическими и экологическими связями. Их тесная взаимосвязь определяет их коэволюцию и становится необходимым условием успешного закрепления каждого вида в экологической системе [1, 2].

Переход к промышленному животноводству оказал существенное влияние на характер взаимодействий макро- и микроорганизмов. В первую очередь изменились количественные характеристики. Увеличение плотности популяции животных поспособствовало заметному росту биомассы микроорганизмов в условиях созданных человеком аграрных экосистем [1]. В свою очередь, изменения количественного характера привели к качественной перестройке взаимоотношений животных и микроорганизмов. Последние, оказавшись более адаптационно пластичными, реализовали потенциал к изменению своих экологических характеристик и проявили свою способность в определенных условиях вызывать заболевания сельскохозяйственных животных. В результате вызываемые условно-патогенной микрофлорой заболевания стали одной из ключевых проблем современной ветеринарии сельскохозяйственных животных.

Основным источником условно-патогенной микрофлоры следует считать биотопы окружающей среды – животноводческие помещения и их конструктивные элементы, которые следует признавать основными факторами эпизоотического риска [7]. Именно здесь сосредоточена основная масса микроорганизмов бактериальной и грибковой природы; меньшая их часть заселяет биотопы организма животных. В связи с этим основным этапом профилактических мероприятий при оппортунистических инфекциях следует считать дезинфекцию животноводческих объектов [3].

Спектр методов и средств дезинфекции, применяемых в ветеринарии, весьма широк. В производстве наиболее часто применяют средства химической дезинфекции. Однако они не всегда соответствуют требованиям безопасности и экологичности, и, что немаловажно, не всегда оказываются эффективными [4, 5]. Кроме этого, выбор вида средства дезинфекции зависит от инфекции, возбудителя которой оно должно уничтожать [6]. Поэтому при оппортунистических инфекциях ключевым критерием выбора дезинфицирующего средства должна быть широта спектра ан-