

Из таблицы 3 следует, что в сыворотке крови облученных животных и крыс, подвергшихся стрессу и сочетанному действию ионизирующего излучения и стресса значения концентрации прогестерона близки к контрольным.

Заключение. В результате проведенного исследования было выявлено, что самые выраженные изменения в концентрации прогестерона наблюдались на 3 сутки после облучения, стресса, сочетанного действия облучения и стресса. В сыворотке крови всех трех опытных групп отмечалось резкое снижение содержания гормона. Такое изменение концентрации прогестерона, вероятно, было результатом развития стресс-реакции в первые сутки после воздействия стрессорного и радиационного факторов. На 10 сутки происходило увеличение содержания гормона, а к 30 суткам значения концентрации прогестерона в крови опытных животных были близки к контрольным значениям, что свидетельствует о проявлении эффектов на ранних стадиях.

В заключении необходимо отметить, что выяснение молекулярных механизмов изменения эндокринной регуляции после действия острого ионизирующего излучения при сравнительно малых дозах внешнего действия радионуклидов на фоне острого стрессорного воздействия является одной из наиболее актуальных и острых в настоящее время проблем радиобиологии и медико-биологической науки. Это обусловлено несколькими причинами, основными из которых являются радиоэкологическое загрязнение территорий Беларуси после Чернобыльской трагедии, рост числа сопутствующих заболеваний, в особенности репродуктивных дисфункций, и необходимость разработки новых методов прогноза, лечения и профилактики различных отклонений у людей, подвергшихся радиационным и стрессорным воздействиям.

Литература. 1. Абрамов С.С., Шевченко И.С. *Руководство по ветеринарной эндокринологии.* – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 59с. 2. Барабой В.А. *Радиобиология и уроки Чернобыля // Радиобиология.* – 1990. – №4. – С. 435-440. 3. Дядя Г.И. *Полный справочник эндокринолога.* – Москва: Эксмо, 2005. – 896с. 4. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т.2 – 2-е изд.* – Минск: Беларусь, 2002. – 463с. 5. *Лабораторные животные (разведение, содержание, использование в эксперименте) / И.П. Заподнюк и др.* – Киев: Вища школа, 1983. – 383с. 6. Мамбетова А.Ж., Матюшин А.И. *Механизмы кардиопротекторного действия эстрадиола // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2000. – №1. – С. 67 – 69. 7. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам.* – Москва: Медицина, 1988. – 256с. 8. Розен В.Б. *Основы эндокринологии: Учебное пособие для ун-тов по спец. "Биология".* – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Высш. шк., 1984. – С. 289-295. 9. Розен В.Б. *Основы эндокринологии.* – Москва: Изд-во МГУ, 1994. – 384с. 10. Северюк И.З., Шевченко И.С., Рубанец Л.Н. *Пособие по эндокринологии.* – Витебск: УО ВГАВМ, 1998. – 62с. 11. Судаков К.В. *Новые акценты классической концепции стресса. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1997. – №2. – С. 124 – 129. 12. Тигранян Р.А. *Гормонально-метаболический статус организма при экстремальных воздействиях.* – Москва: Наука, 1990. – 68с. 13. Тронько Н.Д., Беникова Е.А., Олейник В.А. *Радиоактивное излучение и железы внутренней секреции.* – Киев: Здоровья, 1990. – 21с. 14. Холодова Е.А. *Справочник по клинической эндокринологии.* – Минск: Беларусь, 2004. – 542с. 15. Ashby J.P., Shirling D., Baird J.D. *Endocrinology.* – 1981. – Vol. 88 – P. 49. 16. Carvallo A.C.A., Vailancout R.A., Cabnab R.B., Lee R.S., Colman R.W. *J. Am. Med. Assoc.* – 1977. – Vol. 237. – P. 825

УДК 636.2.034:612.02

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СПЕРМЫ ВНЕ ОРГАНИЗМА

Ганджа А.И., Леткевич Л.Л., Костинова И.В., Ракович Е.Д., Гришкина О.В.*, Лобанок Е.С.**, Никольская В.П.**, Мотузко Н.С.***

*РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино,

**ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»,

*** УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

В опытах установлено, что добавление в среду для оплодотворения эстрофана в концентрации 50 мкг/мл позволяет получать 18,5% эмбрионов на стадии морула-бластоциста. Воздействие направленного поляризованного света в течение 10 сек. с интенсивностью 40 мВт/см² приводит к повышению выхода преимплантационных эмбрионов на 3,8%. Изучено функциональное состояние замороженно-оттаянной спермы после капацитации.

In experiences it is established, that addition on Wednesday for fertilization of estropane in concentration of 50 mkg/ml allows to receive 18,5 % of embryos at a stage morula-blastocistis. Influence of directed polarized light during 10 c. with intensity 40 mVt/cm² leads to increase of an output treplantacionnich embryos on 3,8 %. The functional condition of the zamorogeno-thawn sperm after kapacitacii is studied.

Введение. Активное внедрение клеточных репродуктивных технологий в животноводство является приоритетным в экономической политике многих стран мира. Резкое снижение воспроизводительной функции высокопродуктивных молочных коров становится мировой проблемой, решение которой заключается в применении современных достижений биотехнологии репродукции, к которой относится и технология получения преимплантационных эмбрионов из созревших вне организма яйцеклеток. В настоящее время во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров.

Успешное оплодотворение яйцеклетки как *in vivo*, так и *in vitro* происходит при выполнении двух условий: яйцеклетка должна созреть, а сперма пройти подготовку к оплодотворению. В естественных условиях сперматозоиды в половых путях самки в течение нескольких часов претерпевают существенные изменения, необходимые для приобретения ими оплодотворяющей способности. Они состоят в преобразовании строения клеточных

мембран на головке спермиев, слиянии плазматической мембраны с оволемой (акросомная реакция), а также в обеспечении исходно неподвижных половых клеток необходимыми веществами для придания им плавательной активности. Этот процесс в естественных условиях занимает несколько часов. В искусственных условиях подготовка спермы к оплодотворению (капацитация) происходит значительно быстрее. Окончательной стадией преобразования спермиев при постановке опытов *in vitro* можно считать приобретение ими оплодотворяющей способности.

Многочисленные исследования показали, что капацитации сперматозоидов вне организма способствуют факторы, дестабилизирующие состояние их мембран, индуцирующие их акросомную реакцию, повышающие оплодотворяющую способность. Ряд ученых показали высокую эффективность влияния кофеина на капацитацию спермиев [1, 2, 3]. Присутствие простагландина в организме самки положительно сказывается на жизнеспособности спермиев. Однако данные литературы по влиянию простагландина на сперматозоиды в условиях *in vitro* противоречивы: он либо несколько подавляет, либо не влияет на морфологию акросом и подвижность сперматозоидов [4, 5].

Имеется ряд работ, в которых сообщается о положительном воздействии физических факторов на созревание яйцеклеток. Отмечается положительный эффект стимуляции развития клеток импульсным электрическим полем, гелийнеоновым лазером. Ранее было доказано положительное влияние постоянного магнитного поля на качественные показатели спермы при искусственном оплодотворении [6, 7].

В технологии *in vitro* чаще всего используют замороженно-оттаянную сперму быков. Замораживание и последующее оттаивание спермиев индуцирует развитие неблагоприятных внутриклеточных изменений (увеличение уровня реактивных форм кислорода, повреждение мембранных структур), снижает выживаемость и функциональную активность клеток. Плазматическая мембрана сперматозоидов содержит достаточно большое количество ненасыщенных жирных кислот, подвергаемых перекисному окислению, что вызывает ее дестабилизацию, нарушение ионного гомеостаза клетки, снижение потенциала митохондрий и плазматической мембраны, фрагментацию ДНК, падение и без того низкой антиоксидантной защиты [8, 9, 10].

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось повышение эффективности оплодотворяющей способности спермиев вне организма с использованием гормональных и биофизических способов воздействия, установление метаболических критериев жизнеспособности спермиев.

Материал и методика исследований. Исследования были проведены в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных РУП «Научно-производственный центр НАН Беларуси по животноводству» и лаборатории биофизики и инженерии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Объектом исследований служила замороженно-оттаянная сперма крупного рогатого скота. После размораживания сперму помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и ставили в термостат на 1 час с целью разделения подвижных и неподвижных (погибших) спермиев. В качестве основной питательной среды для капацитации использовали среду Тироде. С целью повышения эффективности созревания спермиев в основной питательной среде добавляли синтетические аналоги простагландина F_{2a} эстрофан и тимэстрофан в количестве 25, 50, 100 мкг/мл. В качестве капацитирующего агента использовали гепарин (150 ед/мл) и кофеин в различных дозах (2, 4, 8 мг/мл р-ра). Дальнейшие манипуляции со спермой проводили согласно общепринятым методикам: методы разбавления, центрифугирования, ресуспендирования и инкубации в различных средах. Затем сперму в количестве $1 \cdot 10^6$ сперматозоидов в 1 мл добавляли к созревшим к этому времени ооцитам для определения ее оплодотворяющей способности. Ооцит-кумульсные комплексы (ОКК) выделяли рассечением ткани яичников, полученных на мясокормбинате после убоя животного. Созревание ооцитов проводили по разработанной нами схеме в течение 24 часов в CO_2 -инкубаторе во влажной среде при температуре $39^\circ C$ и присутствии 5% CO_2 в воздухе. Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась 18-20 часов при температуре $39^\circ C$ в атмосфере с 5% CO_2 и максимальной влажности. С целью увеличения жизнеспособности спермы изучалось влияние лазерного излучения и направленного поляризованного света на жизнеспособность и оплодотворяющую способность сперматозоидов путем воздействия данных физических факторов на свежеразмороженную сперму и после ее капацитации. Для проведения работ использовали магнито-лазерный аппарат «Вектор-03» и лампу поляризованного света «Биоптрон». На свежеразмороженную сперму воздействовали лазерным лучом с частотой 5 и 10 Гц в течение 10 и 20 сек. Поляризованным светом воздействовали на сперму либо сразу после проведения *swim-up* процедуры, либо после процесса капацитации в течение 10 сек. Эффективность капацитации определяли по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Была проведена сравнительная характеристика функционального состояния замороженно-оттаянных сперматозоидов быков-производителей после капацитации в течение 2-х часов путем определения интенсивности перекисного окисления липидов, внутриклеточного содержания АТФ (адезинтрифосфата), интенсивности дыхания и мембранного потенциала.

Все манипуляции с яйцеклетками, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота проводили под микроскопом МБС-10 при увеличении в 56 крат.

Результаты исследований. Изучено влияние синтетических аналогов простагландина F_{2a} (эстрофана, тимэстрофана) на оплодотворяющую способность спермиев крупного рогатого скота при получении эмбрионов вне организма (табл. 1).

В результате исследований установлено, что добавление в среду для капацитации как эстрофана, так и тимэстрофана в дозе 50 мкг/мл привело к увеличению уровня дробления по сравнению с контролем на 3,1-2,3%, соответственно. Уменьшение концентрации простагландина до 25 мкг/мл снижало уровень дробления как по сравнению с контролем на 8,8-10,4%, так и с вышеуказанной группой на 11,9 – 12,5%, соответственно. Увеличение концентрации эстрофана до 100 мкг/мл привело к значительному снижению уровня дробления – на 13,5% по сравнению с контролем. Однако в данной группе был самый высокий выход эмбрионов на преимплантационных стадиях развития – 16,6%, что выше по сравнению с группами капацитирующимися в среде с добавлением 25 и 50 мкг эстрофана на 9,1–5,5%, а тимэстрофана – на 7,8-5,7%.

При добавлении эстрофана в среду для оплодотворения уровень дробления составил 29,6%, но при

этом было получено 10 эмбрионов на стадии морула-бластоциста, что составило 18,5% от числа ооцитов, поставленных на созревание.

Таблица 1 – Влияние эстрофана и тимэстрофана на оплодотворяющую способность спермиев

Варианты опыта	Концентрация, мкг/мл	Количество ооцитов, п	Уровень дробления, п-%	Выход морул-бластоцист, п-%
Контроль	-	46	19-41,3	7-15,2
Эстрофан в среде для капацитации	25	40	13-32,5	3-7,5
	50	27	12-44,4	3-11,1
	100	54	15-27,8	9-16,6
Эстрофан в среде для оплодотворения	25	54	16-29,6	10-18,5
Тимэстрофан в среде для капацитации	25	68	21-30,9	6-8,8
	50	46	20-43,4	5-10,9

При подготовке спермы к оплодотворению вне организма в качестве капацирующего агента широко используется гепарин. Однако встречаются работы, где указано, что применение кофеина также способствует успешному прохождению процедуры капацитации. Наши исследования показали, что использование кофеина не способствовало повышению оплодотворяющей способности спермы (табл. 2).

Таблица 2 – Эффективность применения кофеина в качестве капацирующего агента

Концентрация кофеина, мг/мл р-ра	Всего оплодотворенно клеток, п	Уровень дробления, п-%	Выход морул-бластоцист, п-%
2	40	8-20,0	3-7,5
4	32	5-15,6	-
8	27	7-25,9	4-14,8
Контроль (гепарин)	36	14-38,9	6-16,7

Уровень дробления по сравнению с контрольной группой был ниже и составлял от 15,6 (при концентрации кофеина 4 мг/мл раствора) до 25,9% (при концентрации кофеина 8 мг/мл раствора). При этом выход морул-бластоцист при использовании кофеина в концентрации 2 мг/мл составлял 7,5%, при использовании концентрации 8 мг/мл – 14,8%, что ниже по сравнению с контролем на 9,2-1,9%. При концентрации кофеина 4 мг/мл преимплантационных эмбрионов не получено.

Воздействие лазерного луча с частотой 5 Гц в течение 10 сек. на свежеразмороженную сперму позволило получить 44,1% дробящихся клеток от числа поставленных на культивирование (15 из 34), а также 5 эмбрионов на стадии морула-бластоциста, что составляет 14,7% от оплодотворенных клеток. Увеличение времени экспозиции лазерного луча до 20 сек. не позволило получить дробящихся клеток. После воздействия лазерным лучом мощностью 10 Гц в течение 10 сек. было получено 8 клеток на 8-16 клеточной стадии, что составило 25,0% от числа поставленных на культивирование. Зародышей на преимплантационных стадиях не получено. По-видимому, воздействие лазерного излучения непосредственно на клетки после разморозки носит неоднозначный характер и требует дальнейших углубленных исследований.

Изучено влияние направленного поляризованного света на физиологические показатели и оплодотворяющую способность спермиев крупного рогатого скота при получении эмбрионов вне организма (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние направленного поляризованного света на эффективность капацитации замороженно-оттаянной спермы крупного рогатого скота

Сроки воздействия поляризованным светом	Всего оплодотворенно клеток, п	Уровень дробления, п-%	Выход морул-бластоцист, п-%
После swim-up процедуры	24	6-25,0	4-16,7
Перед оплодотворением	31	17-54,8	4-12,9

В результате исследований установлено, что воздействие поляризованного света в течение 10 сек. видимых изменений таких показателей, как подвижность и уровень агрегации, не вызывало. В то же время при обработке спермы после swim-up процедуры выход дробящихся эмбрионов составил 25,0% от числа поставленных на культивирование (6 из 24), из них 16,7% развились до ранней морулы. После воздействия поляризованным светом на сперму после её капацитации было получено 17 дробящихся зародышей, что составило 54,8%.

Однако выход зародышей на преимплантационных стадиях в данном опыте был ниже и составил 12,9% от числа оплодотворенных.

Проведена сравнительная характеристика функционального состояния замороженно-оттаянных сперматозоидов в зависимости от индивидуальных особенностей животных и способа заморозки спермы (табл. 4).

Сперма быков Герой и Химозин была заморожена в пайеттах, а быка 500179 в гранулах. Исследовались такие показатели, как интенсивность перекисного окисления липидов, внутриклеточное содержание АТФ, интенсивность дыхания и мембранный потенциал.

Как видно из приведенной таблицы, уровень перекисного окисления липидов был выше у Химозина по сравнению с Героем на 0,57-0,71 усл.ед./10⁶ кл. и спермой в гранулах на 0,58-0,76 усл.ед./10⁶ кл., соответственно.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика функционального состояния замороженно-оттаянной спермы после капацитации

Способ заморозки спермы, быки	Интенсивность перекисного окисления липидов усл.ед./10 ⁶ кл	Внутриклеточное содержание АТФ, нМ/10 ⁶ кл	Интенсивность дыхания, tg α	Мембранный потенциал, мВ
Герой	0,89–0,97	1,17–1,60	0,45–0,63	–35 мВ
Химозин	1,46–1,68	0,23–0,36	0,11–0,15	–18 мВ
500179	0,88–0,92	0,97–1,25	0,41–0,54	–33 мВ

В то же время внутриклеточное содержание АТФ как одного из показателей жизнеспособности у клеток спермы Героя составило 1,17-1,60 нМ/10⁶ кл., что превышало аналогичный показатель клеток, замороженных в гранулах на 0,2-0,35 нМ/10⁶ кл., а клеток Химозина – 0,94-1,24 нМ/10⁶ кл. Интенсивность дыхания клеток Героя и быка 500179 находилась на одинаковом уровне и значительно превышала интенсивность дыхания клеток Химозина. Аналогичная зависимость наблюдается и по мембранному потенциалу –35–33мВ против –18 мВ. Выход эмбрионов при оплодотворении созревших ооцитов спермой Героя составил 17,3%; спермой быка 500179 – 16,4%; при использовании спермы Химозина преимплантационных эмбрионов получено не было.

Заключение. Добавление в среду для капацитации 50 мкг/мл простагландина увеличивало уровень дробления на 2,3–3,1%, но при этом снижался выход эмбрионов на преимплантационных стадиях. Увеличение концентрации эстрофана в среде для капацитации до 100 мкг/мл, а также добавление его в среду для оплодотворения позволило увеличить выход эмбрионов на стадии морула-бластоциста до 16,6–18,5%.

При использовании в качестве капацитирующего агента кофеина в количестве 8 мг/мл при подготовке спермы крупного рогатого скота для оплодотворения *in vitro* выход эмбрионов составил 16,7% при уровне дробления 25,9%.

Воздействие направленного поляризованного света на сперматозоиды после их созревания более эффективно по сравнению с воздействием на неё сразу после *swim-up* процедуры, выход преимплантационных эмбрионов составил 16,7% против 12,9%. Использование лазерного излучения позволило получить 14,7% морул-бластоцист.

Интенсивность дыхания сперматозоидов 0,41-0,63 tg, интенсивность перекисного окисления липидов – 0,88-0,97 усл.ед./10⁶ кл., внутриклеточное содержание АТФ – 0,97-1,60 нМ/10⁶ кл. и мембранный потенциал – 33-35мВ позволяют получать при оплодотворении созревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота 16,4–17,3% преимплантационных эмбрионов при уровне дробления 39,8–42,3%.

Выводы. Повышение эффективности оплодотворяющей способности спермы вне организма можно достигнуть введением 25 мкг/мл эстрофана в среду для оплодотворения, при этом выход преимплантационных эмбрионов составит 18,5%. Воздействие направленного поляризованного света в течение 10 сек. с интенсивностью 40 мВт/см² позволяет увеличить выход морул-бластоцист на 3,8%.

Литература. 1. Сураева, Н.М. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток / Н.М. Сураева, А.З. Кесян, М.И. Прокофьев // Вестн. акад. с.-х. наук. – 1993. – №4. – С. 49-50. 2. *In vitro* penetration of pig oocytes by commercially prepared frozen-thawed. Boar spermatozoa in a chemically semi-defined bicarbonate-free medium / L. Abeydeera, H. Funahashi, N. Kim, B. Day // Theriogenology. – 1996. – Vol. 45. – № 1. – P. 265. 3. Effect of Group Culture and Embryo-culture Conditioned Medium on Development of Bovine Embryos / T. Fujita, H. Umeki, H. Shimura, R. Kugumiya, K. Shiga // J. of Reproduction and Development. – 2006. – Vol. 52. – №1 – P. 137-142. 4. Effect cloprostenol treatment at artificial insemination on sow fertility / R.N. Kirkwood, De Rensis F., P. Silva et al. // Reprod. Domest. Anim. – 2007. – Vol. 42. – № 2. – P. 26-28. 5. Kozumplik, J. The effect of Oestrphan Spofa (synthetic analog of prostaglandin F2 alpha) added to the insemination dose on pregnancy and fertility in sow / J. Kozumplik, J. Martinek // Vet. Med. (Praha). – 1986. – Vol. 31. – № 4. – P. 227-232. 6. Колесникова, А.А. Стимуляция развития ооцитов млекопитающих *in vitro* / А.А. Колесникова, В.А. Шагимага // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: материалы 6-ой Международной конференции, 19-20 декабря 2006 г., ВИЖ – Дубровицы, 2006. – С. 85-87. 7. Карашев, М.Ф. Созревание ооцитов и оплодотворение яйцеклеток крупного рогатого скота *in vitro* в средах с биологически активными веществами: автореф. дис. ... канд. биологических наук / М.Ф. Карашев. – Харьков, 1987. – 25 с. 8. Rogers, B.J. ATP levels in hamster spermatozoa during capacitation *in vitro* / B.J. Rogers, B. Morton // Biol. Reprod. – 1973. – Vol. 9. – P. 361-369. 9. Marchetti, C. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm / C. Marchetti, G. Obert, A. Delfosse, P. Formstecher, Ph. Marchetti // Human Reprod. – 2002. – Vol. 17. – № 5 – P. 1257-1265. 10. Rasul, Z. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa / Z. Rasul, N. Ahmad, M. Anzar // J. Androl. – 2001. – Vol. 22. – № 2. – P. 278-283.