

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ МЕМБРАН СПЕРМИЕВ ЖЕРЕБЦОВ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

В.А. Науменкова¹, М.М. Атрощенко¹, кандидаты биологических наук,
А.Н. Гулов², О.В. Широкова¹, Н.А. Фролова¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства,
391105, Рязанская область, Рыбновский район, п. Дивово
E-mail: naumenkova.00@mail.ru

²Федеральный научный центр пчеловодства,
391100, Рязанская область, Рыбное, ул. Почтовая, 22
E-mail: blee3@yandex.ru

С целью выявления наиболее оптимального и результативного метода определения целостности мембран для спермы жеребцов была проведена сравнительная оценка трех различных методов по определению этого показателя: с помощью окраски эозином, окраски флюорохромами (SYBR-14 + PI) и гипо-осмотического теста. На сперме жеребцов получены высокие коэффициенты корреляции подвижности спермиев с процентом неповрежденных мембран всеми способами определения. Наибольшее совпадение показал метод окраски эозином, давший коэффициент корреляции 0,91, который отличается простотой, доступностью, экономичностью. Для правильной оценки необходимо вычитать из количества неокрашенных спермиев количество неокрашенных патологических спермиев, которые не являются функциональными. Процент подвижных спермиев не совпадает с процентом целых мембран в процессе хранения семени жеребцов по всем способам определения. При полной потере подвижности значительное количество клеток остаются с целыми мембранами в конце хранения. Это свидетельствует о том, что остановка спермиев происходит по причине расходования энергетического материала в митохондриях жгутика и с устойчивостью мембран не имеет связи. Поэтому оценку мембран спермиев жеребцов целесообразно проводить сразу в свежеполученной или оттаянной сперме. Определение целостности мембран желательно использовать для уточнения оценки подвижности сперматозоидов, особенно в сомнительных случаях.

COMPARISON OF ASSESSMENT OF THE MEMBRANE INTEGRITY STALLION SPERM USING OF DIFFERENT METHODS

Naumenkova V.A.¹, Atroshchenko M.M.¹, Gulov A.N.²,
Shirokova O.V.¹, Frolova N.A.¹

¹All-Russian Research Institute for Horse Breeding,
391105, Ryazanskaya oblast, Rybnovskiy rayon, Divovo
E-mail: naumenkova.00@mail.ru

²Federal scientific center of beekeeping
391100, Ryazanskaya oblast, Rybnoye, ul. Pochtovaja, 22
e-mail: blee3@yandex.ru

In order to reveal the most efficient method of determining the membrane integrity of stallion semen, we carried out a comparative evaluation of three different methods of determining this indicator: staining with eosin, staining with fluorochrome (SYBR-14 + PI) and Hypo-osmotic test. The stallion semen showed high indicators of correlation of sperm motility with percentage of intact membranes by all methods of determination. The greatest coincidence was shown by the eosin staining method with a correlation coefficient of 0.91. For correct evaluation, it is necessary to subtract the number of unpainted pathological sperms that are not functional from the number of unpainted sperms. The percentage of mobile sperms does not coincide with the percentage of whole membranes in the process of storing of stallions sperm by all methods of determination. With complete loss of mobility, a significant number of cells remain with intact membranes at the end of storage. This shows that the stoppage of sperm occurs due to the expenditure of energy material in the mitochondria of the flagellum, and has no connection with the stability of the membranes. Therefore, it is advisable to evaluate the membranes of stallion sperm immediately in freshly obtained or thawed sperm. This study showed that the determination of membrane integrity is desirable to conduct to evaluate the mobility, especially in doubtful cases. For semen, the most preferred method of staining sperm is with eosin, which is characterized by simplicity, availability and cost effectiveness.

Ключевые слова: сперма жеребцов, целостность мембран, окрашивание, эозин, флюорохромы, гипо-осмотический тест

Key words: stallion sperm, membrane integrity, coloration, eosin, fluorochromes, hypoosmotic test

Определение качества спермы включает оценку подвижности, концентрации, морфологии, выживаемости [1]. При отборе спермы для криоконсервации кроме обычных показателей добавляются дополнительные характеристики: устойчивость клеток к холодовому шоку, к осмотическим воздействиям, целостность акросом и мембран спермиев, дыхательный коэффициент, сохранность ферментов и другие [2, 3].

В медицинской практике по рекомендации ВОЗ считается целесообразным использовать показатель жизнеспособности спермиев, который определяется

по целостности мембран клеток. Считается, что если мембрана не нарушена, то клетка живая. Процент живых сперматозоидов рассчитывают, исходя из реакции клеточной мембраны, по отсутствию окраски или с помощью гипотонического теста [3-5].

При окраске витальными красителями (эозин, эозин-нигрозин, бромфеноловый синий, конго красный, трипановый синий, родамин С, малахитовый зеленый) подсчитывают количество неокрашенных (интактных) и окрашенных клеток с помощью световой микроскопии. Краситель, добавленный к спермиям, проникает в

клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их; живые клетки с целой мембраной не окрашиваются. Считается, что оценка жизнеспособности может служить контролем точности оценки подвижности спермиев, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать процента неподвижных (окрашенных) [5].

Еще один метод определения целостности мембран – это тест на гипоосмотическое набухание [6-8], основанный на том, что только клетки с неповрежденными мембранами изменяются в гипотонических растворах. Живые клетки различают по признакам набухания и скручивания жгутика спермия.

В последние годы широко распространено исследование целостности мембран с помощью флюорохромов [9, 10], дающих свечение в люминесцентном световом диапазоне. Для дифференциации живых и мертвых клеток используют красители, которые считаются ядерными, способными выявлять нарушения клетки на ранних стадиях апоптоза (естественного отмирания) – это акридиновый оранжевый, этидиум бромид, пропидиум йодид, тиазиновый красный, CMFDA, Hoechst 33258, пропидиум йодид + SYBR-14 [9-12]. Применение подобных методов с использованием токсичных красителей приводит к удорожанию испытаний и недоступно для практических работ. Поэтому желательно подобрать недорогой и доступный метод, наиболее пригодный в практике для оценки спермы жеребцов.

С целью выявления наиболее оптимального и результативного метода определения целостности мембран для спермы жеребцов была проведена сравнительная оценка трех различных методов по определению этого показателя: с помощью метода окраски эозином, гипо-осмотического теста и метода окраски флюорохромами (SYBR-14 + PI).

Методика. В опытах были использованы жеребцы экспериментальной конюшни института коневодства. Взятие спермы проводили на искусственную вагину по общепринятой методике. После получения эякулат оценивали по объему, концентрации, подвижности. Разбавление спермы проводили лактозо-желато-цитратно-желточной (ЛХЦЖ) средой, затем подготавливали к замораживанию и замораживали в соответствии с инструкцией [1].

Исследовали качественные показатели разбавленной и охлажденной спермы, а также деконсервированной спермы 20 эякулатов от 7 жеребцов по подвижности спермиев (%), количеству патологических клеток (%) и целостности мембран (%). В опыте по хранению разбавленной спермы, ее выдерживали в условиях холодильника (при 4°C) до полной потери подвижности. Световое микроскопирование спермы проводили на световом биологическом микроскопе «Olympus» CX41 при увеличении 400x с использованием цифровой камеры XC50.

Для определения целостности мембран применяли: метод световой микроскопии с использованием водорастворимого красителя – эозина (по Морозову) [4, 5]; гипоосмотический тест, при котором живые клетки с неповрежденными мембранами набухают в гипотоническом растворе и жгутики скручиваются кольцом, мертвые спермии не изменяются [6-8]; метод двойной флуоресценции, разработанный фирмой Molecular Probes [10], с использованием набора LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit L 7011 (Life Technologies Limited, Scotland). Набор состоит из двух красителей: компонент А (SYBR-14) и компонент В (пропидиум йодид – PI). Жизнеспособные клетки красятся только SYBR-

14 и флуоресцируют ярким зеленым цветом, а мертвые спермии с поврежденной мембраной красятся обоими красителями и флуоресцируют красным цветом от пропидиум йодида [11, 12]. Микроскопирование проводилось на люминесцентном микроскопе Альтами-ЛЮМ 1 LED (С.-Петербург).

Статистическую обработку проводили с использованием программ Microsoft Excel 2010, Statistica 8.

Результаты и обсуждение. В описаниях метода окраски спермы эозином по Морозову обычно указывается 5%-ный раствор. В последние годы чаще всего рекомендуется готовить 0,5-2 или 3%-ный краситель [3-5]. Мы испытали различную концентрацию эозина – от 0,5 до 5%-ной. Все варианты показали одинаковую результативность, но наиболее удобны для просмотра 2 или 3%-ный препарат. В 5%-ном растворе окрашенные клетки сливаются с фоном, а в 0,5-1%-ном клетки выглядят бледно, что затрудняет подсчет.

Кроме того, рекомендуется два варианта приготовления препарата: в виде капли или мазка. При просмотре капельного препарата спермии некоторых жеребцов не прекращают движение в течение 1-2 часов, и это усложняет подсчет. В таких случаях удобнее готовить препарат в виде мазка.

Микроскопирование капельных образцов спермы разных жеребцов, окрашенных эозином, показало, что среди неокрашенных сперматозоидов (живых) часть клеток подвижны, а часть – неподвижны. Среди тех и других имеются морфологически измененные, т.е. паталогические формы. Таким образом, не все неокрашенные, так называемые «живые», функциональны. Похожую картину отмечают многие исследователи [8, 13-16]. Такое явление авторы объясняют тем, что витальные красители не выявляют клетки в начальной стадии апоптоза (естественного отмирания), а проникают под оболочку только на поздних этапах, т.е. после разрушения клеточной мембраны.

С целью раннего обнаружения начальных этапов апоптоза клеток применяют флюорохромные красители, проникающие под мембрану и окрашивающие ядро [9-12]. Считается, что эти красители наиболее точно выявляют число погибших клеток.

Результативность использованных нами методов определения целых мембран спермиев (окраска с эозином, гипо-осмотический тест и окраска с флюорохромами (SYBR+PI) представлена на рисунке 1.

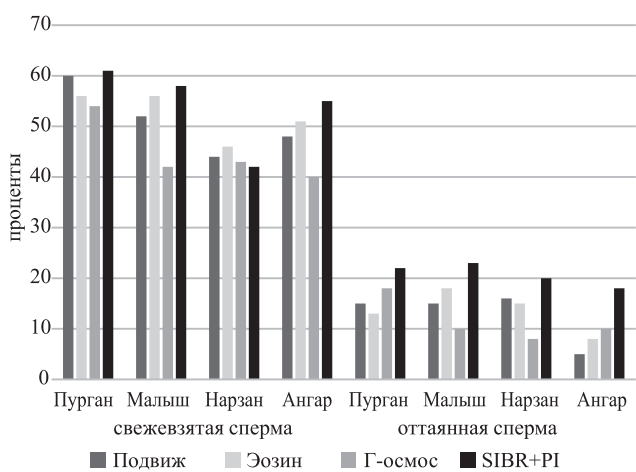


Рис. 1. Подвижность спермы и целостность мембран отдельных жеребцов, %.

Табл. 1. Подвижность и сохранность мембран свежей и заморожено-оттаянной спермы, %

Метод определения	Свежевзятая сперма		Заморожено-оттаянная сперма		Коэффициент корреляции
	подвижность	целых мембран	подвижность	целых мембран	
Окраска эозином		53±7		27±3	0,91
Гипо-осмотический тест	55±3	45±3	25±1,5	18±2	0,76
Окраска с флюорохромами (SYBR+PI)		60±5		32±4	0,80

Наибольший процент живых клеток был получен в случае окрашивания с флюорохромами, наименьший – при использовании гипо-осмотического теста (табл. 1). Использование эозина в среднем дало более высокий результат целых мембран относительно подвижности спермиев, но при вычитании паталогических неокрашенных спермиев отличия упали до минимальных значений и находились в пределах ошибки.

При окраске эозином хорошо различимы паталогические спермии, что невозможно оценить ни с флюорохромными красителями, ни при постановке гипо-теста. После вычитания из общего количества неокрашенных клеток количества неокрашенных паталогических спермиев получается результат, который имеет высокий коэффициент корреляции с подвижностью – 0,91. При использовании гипо-теста и при окраске флюорохромами также получены высокие коэффициенты корреляции 0,76 и 0,8, соответственно.

Метод окрашивания спермы эозином очень прост, доступен, экономичен. Использование современных видеосистем позволяет проводить быстрый подсчет без большого напряжения для глаз с возможностью сразу же считать и паталогические виды спермиев.

В опыте по установлению сохранности мембран спермиев в процессе хранения (табл. 2) все примененные методы показали, что при полной потере подвижности процент целых мембран снижается, но снижение происходит не одновременно с подвижностью и не до нуля (рис. 2). Значительное количество клеток остаются с целыми мембранами до конца хранения при полной остановке движений. У некоторых жеребцов количество целых мембран вообще не снизилось в течение хранения, т.е. прекращение подвижности спермиев происходит по причине расходования энергетического материала в митохондриях жгутика, и не имеет связи с целостностью мембран.

Установлено, что наибольший процент целых мембран был получен в случае использования окраски с флюорохромами, наименьший – при применении гипо-осмотического теста. Световая микроскопия с эозином наиболее адекватно отражает состояние наружной мембраны клетки и является более доступным методом с точки зрения технической оснащенности и экономичности.

Полученные нами данные не согласуются с результатами сравнительных опытов других авторов. Так, в исследованиях Евдокимова В.В. с соавторами [14, 15] при использовании окраски эозином и флюорохромами окрашивание свежей спермы мужчин было одинаковым, но после повреждения мембран и замо-

Табл. 2. Подвижность и сохранность мембран спермиев в процессе хранения, %

Метод определения	Начало хранения		Конец хранения	
	подвижность	целых мембран	подвижность	целых мембран
Окраска эозином		52±7		20±4
Гипо-осмотический тест	48±0,5	42±4	2±0,2	14±3
Окраска с флюорохромами (SYBR+PI)		60±8		26±5

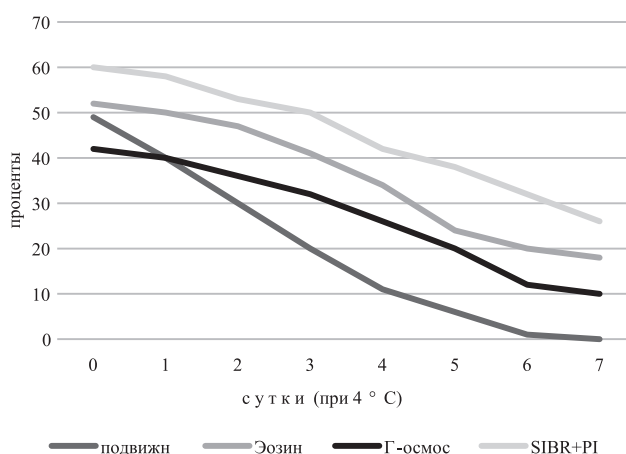


Рис. 2. Подвижность спермиев и целостность мембран в процессе хранения спермы.

раживания окраска флюорохромами лучше выявляла повреждения. В опытах Плосконос М.В. [16] поврежденные мембраны спермиев лучше выявлялись эозином на начальных этапах и в процессе хранения, а при окислительном повреждении – при использовании флюорохрома PI. Для спермы птиц [17] окрашивание флюорохромами (SYBR-14 + PI) было более эффективным в свежей сперме, чем эозин-нигрозином, с оговоркой, что результаты были сопоставимы после оттаивания спермы. Низкая корреляция была получена в исследовании Bahamondes et.al. [7] при сравнении результатов гипо-осмотического теста с эозиновой окраской спермиев мужчин. На пчелиных спермиях наибольшее количество повреждений мембран было выявлено с помощью флюорохромов, чем гипо-тестом [8]. Вероятно, различия в полученных результатах связаны с морфологическими и биохимическими характеристиками спермы разных видов.

Таким образом, выявлено, что для определения целостности мембран спермиев жеребцов-производителей наиболее предпочтителен метод окрашивания эозином, давший наивысшую корреляцию с подвижностью сперматозоидов, который отличается простотой, доступностью, экономичностью и позволяет параллельно подсчитывать паталогические виды клеток. При использовании окраски флюорохромами (SYBR-14 + PI) и гипо-осмотического теста морфологическое исследование спермиев требуется проводить дополнительно.

Литература

1. Инструкция по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов лошадей. – Дивово: Изд. ГНУ ВНИИ коневодства, 2012. – 72 с.
2. Курбатов А.Д., Платов Е.М., Корбан Н.В., Мороз Л.Г., Наук В.А. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. – М.: Агрпромиздат, 1988. – 256 с.
3. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. – М.: «Капитал Принт», 2012. – 291 с.
4. Шатохина И.С., Кузнецова В.С. Исследование эякулята. – М.: Изд. МОНИКИ, 2014. – 48 с.
5. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А. Руководство по сперматологии. – М.: «СОРЕК-полиграфия», 2002. – 107 с.
6. Fuse, H., Ohta, S., Sakamoto, M., Kazama, T., Katayama, T. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water // *Apidologie*. – 1993. – V.30. – P. 111–116.
7. Bahamondes L., Fazano F., De Lucio M.A., Neves P.A., Bottcher L.F., Lorenzetti G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test // *Andrologia*. – 2001. – V.33. – P. 75–77.
8. Nur Z., Seven-Cakmak S., Ustuner B., Cakmak I. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm // *Apidologie*. – 2012. – V.43. – P. 31–38.
9. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // *Медицинская иммунология*. – 2012. – Т. 14. – № 6. – С. 461–482.
10. Плосконос М.В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы) // *Биохимия*. – 2013. – № 4. – С.3–8.
11. Gamer D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide // *J. Andrologie*. – 1994. – №16. – P.620–629.
12. Garner D.L., Johnson L.A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide // *Biology of Reproduction*. – 1995. – №53. – P. 276–284.
13. Апрощенко М.М., Сафронова О.С., Чекой Н.А. Определение жизнеспособности сперматозоидов жеребцов // *Коневодство и конный спорт*. – 2010. – №6. – С. 13–15.
14. Евдокимов В.В., Харламова Л.А., Айбятов Д.Т., Туровецкий В.Б. Сопоставление методов и условий для качественной оценки сперматозоидов человека // *Проблемы репродукции*. – 2012. – № 3. – С. 68–71.
15. Евдокимов В.В., Харламова Л.А., Айбятов Д.Т., Ерохин А.С., Туровецкий В.Б. Применение проточной цитометрии для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // *Экспериментальная и клиническая урология*. – 2012. – №3. – С. 48–50.
16. Плосконос М.В., Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2014. – № 11. – С. 22–24.
17. Chalah T., Brillard J.P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosyn and dual fluorescence (SYBR-14) // *Theriogenology*. – 1998. – №50. – P. 487–493.

Поступила в редакцию 21.01.20
После доработки 30.01.20
Принята к публикации 06.02.20