



ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ПРОТЕКТИВНАТА РОЛЯ НА НИСКО- МОЛЕКУЛНА ЛИПОПРОТЕИНОВА ФРАКЦИЯ (LDL) ВЪРХУ КРИОТОЛЕРАНТНОСТТА НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КОЧ

ИВАН НИКОЛОВ¹, МИЛКО СЪБЕВ¹, МАРИЯ ИВАНОВА-КИЧЕВА¹, ПАВЕЛ
РАШЕВ¹, ВАСКО ГЕРЗИЛОВ², ХРИСТО ХРИСТЕВ²

¹Институт по биология и имунология на размножаването „акад. К. Братанов“ –
БАН, София

²Аграрен Университетт – Пловдив

INVESTIGATION OF PROTECTIVE ROLE OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN FRACTION (LDL) OVER THE CRYOTOLERANCE OF RAM SPERMATOZOA

IVAN NIKOLOV¹, MILKO SABEV¹, MARIA IVANOVA-KICHEVA¹, PAVEL
RASHEV¹, VASKO GERZILOV², HRISTO HRISTEV²

¹ Institut of Biology and Immunology of Reproduction - BAS, Sofia

² Agricultural University - Plovdiv

ABSTRACT

It was investigated the protective role of mediums for cryopresrvation of ram semen from Black-head Pleven breed and Karakachanian breed. The positive influence of LDL- faction extracted from egg yolk, added to the medium for cryopreservation Triladil (Minitub) over the sperm motility and viability was established

The differences between the spermatozoa cryoresistence of the two breeds was proven.

Key words: ram, semen, cryopreservation, diluents, LDL-fraction,

УВОД

Ролята от прилагането на метода на изкуствено осеменяване е особено важна при подобряване на развъдно-подобрителния процес в животновъдството. В тази връзка технологията за съхраняване на сперма, получена от ценни в генетично отношение разплодници, позволява оптималното им използване. Особено внимание заслужават изследванията, свързани с усъвършенстването на бистехнологиите за ефективно съхраняване на сперма от представляващи интерес за овцевъдството породи. Криоконсервацията като метод за дълготрайно съхранение на семенна течност допринася за успешна реализация на генетичните ресурси на определени популации. В условия на "in vitro" съхранение при ултраниска

температура, особено значима е ролята на криопротективните среди. Установено е, че взаимодействието между спермата и добавъчните среди е важен фактор, който определя съхранението и запазване на интегритета на сперматозоидите и техния оплодителен потенциал. Изследвани са влиянието на различни компоненти и липопротеинови фракции върху криотолерантността на гаметите, но все още механизма на протекция не е достатъчно проучен [2, 6]. Има предположения, че някои от липопротеиновите фракции асоциират със спермалната плазмена мембрана и така предпазват сперматозоидите от увреждащото действие на ниските температури [4, 5, 7]. Според други автори някои от липопротеиновите фракции взаимодействат с протеини от спермалната плазма биоконплекси и по този начин оказват протективен ефект върху сперматозоидите [1, 6, 10]. Изследванията в тази насока са особено актуални при сперматозоиди от коч, където все още проблемът с криоконсервацията не е достатъчно проучен.

Целта на настоящите изследвания е да се проучи протективния ефект на ниско молекулна липопротеинова фракция (LDL), изолирана от яйчен жълтък върху криотолерантността на сперматозоиди от коч при замразяване и размразяване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За експерименталните изследвания е използвана семенна течност, получена по метода на изкуствената вагина от 5 коча – 2 от породата Черноглава плевенска и 3 от Каракачанската.

Получени са общо 18 еякулата – 8 от породата Черноглава плевенска и 10 от Каракачанска порода.

Криоконсервация на спермата

При провеждане на опитите са изпитани 2 криопротективни среди – опитна и контролна. За контрола е използвана средата Triladil (Minitub), с добавка на 25% яйчен жълтък, а за опитна – средата Triladil с включена 20% липопротеинова фракция с ниска плътност (LDH), изолирана от яйчен жълтък.

Изолирането на липопротеиновата фракция се извърши чрез флотирание посредством центрофугиране по метода на Moussa et al [9].

Определянето на криотолерантността на еякулатите, определни за замразяване беше извършено чрез прилагането на тест за криорезистентност на сперматозоидите спрямо температурен шок при 0°C [11].

Еякулатите с подходяща криорезистентност бяха разреждени с използваните среди до достигане на крайна концентрация на сперматозоидите 120 млн. в обем 0.2 см³. След разреждане пробите се поставяха за еквилибрация 4 часа при температура 2-5°C. Замразяването се извърши в пайети по метода на Касу.

Размразяване и оценка на спермата

След криоконсервация и 24-часово съхраняване при ултраниска температура (-196°C), пробите се размразяваха на водна баня при

температура 34⁰С. Спермата се оценяваше по отношение на показателите: обща подвижност на сперматозоидите (ОПС), сперматозоиди с праволинейно настъпателни движения (СПНД), морфологичен статус на гаметите и терморезистентност при 39⁰С за 300 минути.

Данните от изследванията са обработени вариационно-статистически по Student.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Данните от сперматологичните изследвания са представени на таблици 1 и 2.

От изследваните 17 еякулата, 13 (76.47%) – са с коефициент за студоустойчивост на сперматозоидите >0.30, което дава основание да бъдат обработени и криоконсервирани. Останалите 4 (23.53 %) еякулата бяха с понижена криоталерантност на гаметите - <0.30 и бяха бракувани. За породата Черноглава плевенска 7 (87.50 %) от получените еякулати бяха с нормална кioresистентност, а за породата Каракачанска – 6 (66.70 %).

Данните от изследванията на подвижността на сперматозоидите от контролната и опитна група след криоконсервация, разредени с изпитваните криопротективни среди са отразени на фигура 1. Стойностите на подвижността, изразени по показател ОПС са близки при използване на двете протективни среди. Наблюдава се тенденция за по-добра протекция при използване на средата, обогатена с LDL. Също така се установява по-добра протекция на сперматозоидите, отчетена по показателя СПНД.

При сперматологичните изследвания на размразените еякулати, получени от двете породи кочове се установява, че съществува по-добра криоустойчивост по отношение на показателите ОПС и СПНД на сперматозоидите от еякулатите на породата Черноглава плевенска, в сравнение с тези получени от автохтонната Каракачанска порода (съответно $p < 0.05$ и $p < 0.05$).

На фигура 2 са представени данните за терморезистентността на сперматозоидите от коч след замразяване – размразяване. От получените резултати се вижда, че средата с включена LDL-фракция оказва благоприятен ефект върху гаметите. Това се изразява чрез по-високите стойности на тяхната терморезистентност след криоконсервация, отчетена до 5^{-я} час от инкубацията. Очевидни са различията по отношение на процента сперматозоиди със запазени активни настъпателни движения в сравнение с контролните проби ($p < 0.05$). Съществуват породни различия по този показател.

След замразяване и размразяване не се установяват съществени различия на сперматозоиди с нарушена структурна конфигурация при опитните и контролни проби. От изследваните форми на патология най-често са уврежданията на акрозомата на сперматозоидите (набъбнала и разкъсана) – Фигура 3.

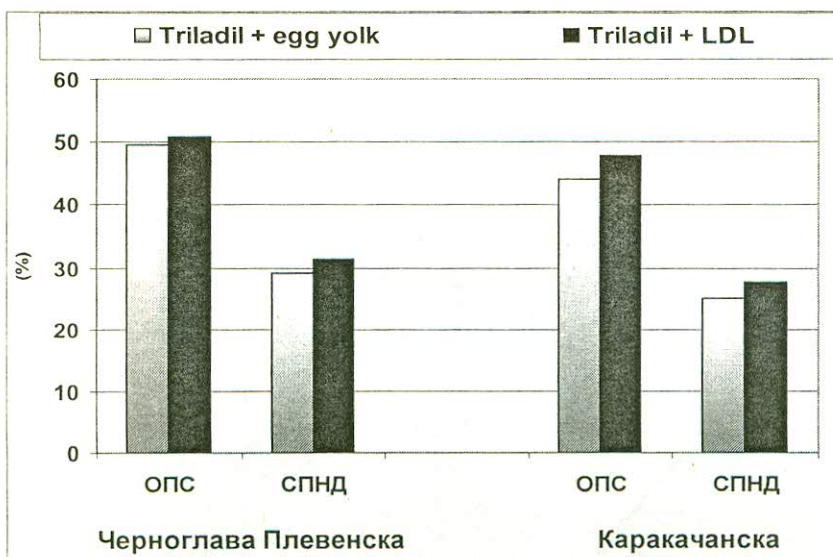
Съществуват данни доказващи, че присъствието на някои от компонентите на яйчния жълтък оказват неблагоприятно въздействие върху сперматозоидите в условия на хипотермия. Според тези изследвания се

Таблица 1. Показатели на сперма от коч след получаването ѝ

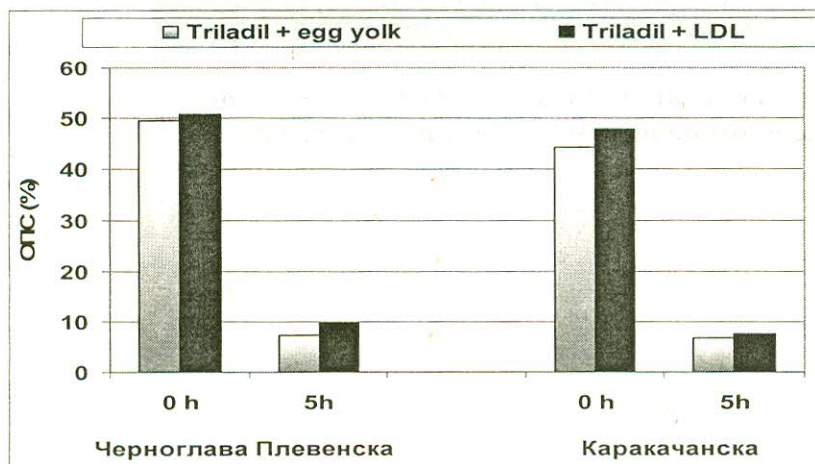
Показатели	Черноглава плевенска n=8	Каракачанска n=10
Обем на еякулата, ml	1.96±0.07	1.49±0.06
Подвижност на сперматозоидите,%	84.70±2.13	81.30±3.72
Концентрация на сперматозоидите, $\times 10^9/ml$	2.73±0.07	2.59±0.08
Патологични сперматозоиди, %	16.29±1.79	19.40±1.94
pH	6.71±0.04	6.74±0.02
Бракувани еякулати, брой (%)		1 (10%)

Таблица 2. Тест за криорезистентност на сперматозоиди от коч

Порода	Изследвани еякулати (n)	Коефициент на студоустойчивост		x±Sx	Бракувани еякулати (n)
		> 0.30	<0.30		
Черноглава					
Плевенска	8	7	1	0.49±0.02	1
Каракачанска	9	6	3	0.43±0.03	3



Фиг. 1. Мотилитет на сперматозоиди от коч преди и след криоконсервация



Фиг. 2. Терморезистентност на сперматозоиди при 39° след размразяване



Фиг. 3. Структурните промени на реанимирани сперматозоиди от коч след криоконсервация

предполага, че тези компоненти подтискат метаболизма на сперматозоидите, като се затормозява процесът на дишане и значително се намалява тяхната подвижност [6, 8].

Според други автори се предполага, че липопротеините от яйчния жълтък асоциират със спермалната плазмена мембрана и по този начин сперматозоидите се предпазват от токсичния ефект на спермалната плазма по време на криоконсервация [2]. Съществува хипотеза, че ниско молекулни липопротеини от яйчния жълтък имат голям афинитет на свързване със серумния протеин при говеда (ГСА), присъстващ в спермалната плазма, като се образува комплекс изключително устойчив на замразяване и размразяване. Предполага се, че този комплекс има протективна роля и предпазва клетките от негативното влияние на ГСА, който предизвиква извличане на холестерола и дестабилизация на плазмената мембрана [3, 6, 8]. Дали тази хипотеза е валидна за другите видове животни все още не проучено достатъчно. От друга страна е установено, че липопротеините с ниска плътност (LDL), влизащи в състава на яйчния жълтък, при замразяване се разпадат на протеини и фосфолипиди.

Предполага се, че последните образуват защитен слой върху плазмената и акрозомална мембрани [8], като се закрепят към тях. Присъствието на такива протеини и фосфолипиди на повърхността на плазмената мембрана вероятно спомагат за понижаване температурата на фазовия преход при кристализацията на водата. По този начин сперматозоидите се предпазват от деструктивното действие на осмотичните процеси и механичното увреждане при кристализацията на вътреклетъчната вода.

Получените резултати дават основание да се приеме, че LDL-фракцията, включена в състава на средата за криоконсервация на сперма от кочове спомага да се поддържа в сравнително висока степен мембранный флуидитет през етапите на криоконсервация и размразяването. В резултат се повишава устойчивостта на плазмената мембрана към неблагоприятното въздействие на ниските температури, вследствие на което се запазва в по-висока степен виталитета на сперматозоидите.

Предполага се, че включването на LDL-фракцията към средата за криоконсервация сперма от кочове би се отразило благоприятно върху резултатите от изкуствено осеменяване на овце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При криоконсервация на сперма от кочове е установен добър протективен ефект на LDL-фракция, изолирана от яйчен жълтък и включена в средата Triladi (Minitub). Установени са по-високи стойности за подвижността (ОПС и СПНД) и терморезистентността на сперматозоидите след криоконсервация и размразяване.

Съществуват различия по отношение на криорезистентността на сперматозоиди от еякулати на кочовете от двете изследвани породи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Angelova A, Al-Khanak, Vassilevski G, Ivanova M. Comparative electrophoretic investigation of proteins from seminal plasma of rainbow trout /salmo gairdner/. *Comptes de "Academie Bulgare des Sciences"* 1982 32 (9): 1295-1298.
2. Banaszak L, Sharrok W, Timmin W. Structure and function of lipoprotein: lipoviltelin. *Annu Rev. Biophys. Chem.* 1991, 20: 221-246.
3. Bergeron A, Cret MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreased the binding of major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from sperm membrane. *Biology of Reprod* 2004, 70: 708-717.
4. Foulkes J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1977, 49: 277-284.
5. Hristev H., Nickolov I, Gerzilov V., Mihajlova D. Electrophoretic profile of ram sperm after dilution with protective medium. *Agricultural University – Plovdiv, Scientific Works* 2005, vol L, book 3, 101-106.
6. Kichev G., I. Nanov, Z. Petkov. The effect of bovine semen dilution on the electrophoretic arrangement of protein complex. *Comptes de "Academie Bulgarie des Sciences"* 1973, 10, 1403-1406.
7. Mac Donald B.J., Foulkes J.A. A spectrofluorometric investigation, using 1-amino-naphthalene-8-sulphonate of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981, 63: 407-410.
8. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. major proteins of bovine plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reprod* 2002, 67: 1250-1258.
9. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Anton M. Low density proteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective method on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002, 57: 1695-1706.
10. Vishwanath R, Shannon P, Curson B, Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1992, 29: 185-194.
11. Ostashko F. Deep freezing and protection animal semen (1978), "Urojai", Kiev