

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭПИДИДИМАЛЬНОЙ, ЭЯКУЛИРОВАННОЙ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЕ ЖЕРЕБЦОВ*

М.М. АТРОЩЕНКО¹, В.В. КАЛАШНИКОВ¹, Е.Е. БРАГИНА², А.М. ЗАЙЦЕВ¹

Криоконсервация спермы — важный прием сохранения генетических ресурсов животных. В коневодстве этот вопрос актуален в большей степени, чем в других отраслях животноводства, так как в настоящее время численность многих пород лошадей (особенно уникальных пород отечественной селекции) приближается к критическому уровню. Для ряда аборигенных пород из-за особенностей табунно-тебеневочной технологии содержания невозможно получение спермы для криоконсервации традиционным методом, и единственным экономически оправданным способом создания криобанков остается получение эпидидимального семени. Технология получения и криоконсервации спермы производителей включает ряд критических этапов, характеризующихся снижением ее качества. К ним можно отнести процедуру взятия, разбавление, температурный шок при замораживании и оттаивании. В работе нами впервые проведено сравнительное изучение ультраструктуры эякулированных и эпидидимальных сперматозоидов у одних и тех же жеребцов, что исключило влияние особенностей организма разных особей на сопоставляемый признак. С использованием электронной микроскопии показано, что на всех этапах работы со спермой наиболее уязвимым органоидом были акросомы. Преобладающей патологией при получении и криоконсервации спермы оказалось отсутствие внутреннего содержимого акросом, что ведет к их ферментной недостаточности. Частота этой патологии в свежеполученной эпидидимальной сперме составила 12,4 %, в эякулированной — 14,0 %, после замораживания и оттаивания анализируемый показатель увеличивался практически вдвое, достигая соответственно 26,5 и 27,4 %. Доля спермиев со второй по распространенности патологией — деградацией акросомы (преждевременным высвобождением ферментов, растворяющих оболочку яйцеклетки, вследствие чего утрачивается способность сперматозоида к оплодотворению) при криоконсервации возрасла на 5,9 % ($p < 0,05$) для эпидидимальной и на 8,9 % ($p < 0,01$) для эякулированной спермы. К самым устойчивым к криоконсервации органоидам относилось ядро половых клеток, однако у двух жеребцов после замораживания и оттаивания спермы отмечали изменение формы ядра и вакуолизацию хроматина сперматозоидов (частота — 1,6-6,1 %). Менее чем у 10 % спермиев наблюдали патологии митохондрий. Аксонема сперматозоидов была достаточно устойчива к криоконсервации. Наружные плотные фибриллы и фиброзная оболочка аксономы практически не повреждались ни при получении спермы, ни при замораживании и оттаивании. Отмеченные различия по ультраструктурной целостности органоидов в пользу эпидидимальных спермиев по сравнению с эякулированными не были статистически значимыми. Таким образом, при получении спермы ультраструктурные повреждения минимальны, основные патологии проявлялись после криоконсервации. Ультраструктурные характеристики состояния сперматозоидов в эпидидимальном семени позволяют рекомендовать этот метод получения спермы для формирования криобанков в случаях, когда по тем или иным причинам отсутствует возможность воспользоваться традиционными способами. Технология формирования криобанков эпидидимальным семенем также может применяться при необходимости ранней кастрации жеребцов, в частности в спортивном и продуктивном коневодстве.

Ключевые слова: жеребцы, электронная микроскопия, эпидидимальная сперма, эякулированная сперма, криоконсервация.

Искусственное осеменение кобыл свежеразбавленной, охлажденной и криоконсервированной спермой позволяет наиболее широко использовать генетический потенциал жеребцов (1). Метод криоконсервации спермы и технологии повышения репродуктивного статуса жеребцов-производителей важны при сохранении генетического разнообразия и селекционной работе в коневодстве. Преимущества криоконсервации очевидны: ее применение позволяет создавать банки спермы высокоценных производителей, в течение долгого времени сохранять генетический материал для селекции, транспортировать сперму на большие расстояния (2).

Для криоконсервации эякулированной спермы жеребцов разрабо-

* Исследования проводились при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-16-01109).

таны и успешно применяются различные технологии (3-5). Тем не менее, получение и криоконсервация спермы жеребцов-производителей включает ряд критических этапов, на которых качество спермы снижается (6). К ним можно отнести процедуру взятия, разбавление, температурный шок при замораживании и оттаивании. В ряде случаев объективно возникает необходимость в криоконсервации эпидидимального семени, например при гибели высокоценных жеребцов или травмах с неблагоприятным прогнозом к выздоровлению (7-9). Для некоторых уникальных аборигенных пород с табунно-тебенёвочным содержанием использование эпидидимального семени — единственное экономически оправданное мероприятие при формировании криобанков.

Главная проблема при криоконсервации спермы — ее качество после оттаивания (10). В основном оно ухудшается вследствие уменьшения количества активных сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением, снижения выживаемости спермиев и их структурных нарушений. Морфология сперматозоидов, наряду с подвижностью и выживаемостью, относится к важнейшим показателям качества спермы (11). Увеличение доли аномальных половых клеток в эякуляте в разной степени связано с меньшей плодовитостью жеребцов (12-14). Вследствие ряда биологических особенностей таких сперматозоидов их оплодотворяющая способность снижена (15). Обычно сперму изучают с помощью световой микроскопии, что не позволяет выявить значительную часть ультраструктурных повреждений в сперматозоидах. При низкой фертильности жеребцов рекомендуется проводить дополнительные исследования спермы (16), в частности электронную микроскопию (17). На сегодняшний день это наиболее точный метод ультраструктурного анализа (18), применяемый для определения этиопатогенеза патозооспермии, функционального состояния сперматозоидов и диагностики нарушений в половых клетках вследствие криоконсервации.

Сперматозоиды из семявыносящих канальцев поступают в эпидидимис, где происходит их окончательное созревание и приобретает способность к оплодотворению (19-22). В придатках семенников в общей сложности содержатся от 15 до 25 млрд сперматозоидов (23, 24). Поэтому извлечение сперматозоидов из эпидидимиса позволяет получать достаточное количество половых клеток для искусственного осеменения как свежеразбавленной, так и охлажденной и криоконсервированной спермой.

Подвижность, морфологию, целостность ДНК, жизнеспособность сперматозоидов в эякулированной и эпидидимальной сперме исследовали многие авторы (7, 24-26). Примененные нами впервые методические подходы позволили провести сравнительный анализ ультраструктуры половых клеток (при разных способах получения и после криоконсервации) на биологическом материале от одних и тех же жеребцов, что исключало влияние индивидуальных особенностей разных особей на сопоставляемый признак. Это дает новые знания о состоянии и сохранности органоидов при замораживании-оттаивании эпидидимальных и эякулированных сперматозоидов.

Целью настоящей работы было сравнение ультраструктуры сперматозоидов из эпидидимиса и эякулята, подвергнутых криоконсервации, и диагностика основных патологий органоидов.

Методика. Эякулированную сперму получали с интервалом 48 ч с помощью искусственной вагины у 5 жеребцов разных пород в возрасте от 5 до 8 лет (показатели спермы первых двух эякулятов после периода полового покоя при обработке данных не учитывали). Эякуляты оценивали по

объему, содержанию, подвижности, морфологии (27), выживаемости сперматозоидов при температуре 2-4 °С, по времени сохранения их подвижности (3). При разбавлении спермы использовали лактозо-желатин-цитратно-желточную (ЛХЦЖ) среду в объемном соотношении 1:3 (3). Сперму замораживали в парах жидкого азота по стандартной технологии Всероссийского НИИ коневодства и хранили в жидком азоте при температуре -196 °С. После отбора эякулированного семени жеребцов кастрировали для получения эпидидимальной спермы, которую разбавляли и замораживали по той же технологии.

Для проведения электронной микроскопии нативные и криоконсервированные образцы эякулированной и эпидидимальной спермы разводили изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:10, добавляли фиксатор — 2,5 % раствор глутарового альдегида («Ted Pella Inc.», США), приготовленный на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2) («Sigma», США), центрифугировали 15 мин при 1000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость, осадок фиксировали тем же фиксатором, дофиксировали 1 % раствором осмиевой кислоты («Serva», Германия) и заливали в эпон («Fluka», Германия). Ультратонкие срезы получали на микротоме UltraCut III («Reichert Jung Optische Werke AG», Австрия), докрашивали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца («Serva», Германия) и просматривали в электронном микроскопе Hitachi 700 (Япония). Общий вид сперматозоидов изучали при увеличении ×5000, акросомы, хроматин ядра и митохондрии — при ×16000-18000, аномалии аксонемы на поперечных срезах жгутиков — при ×20000-25000. В каждом образце анализировали не менее 150 половых клеток.

Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. В таблице представлены средние (\bar{X}) и стандартные ошибки средних (x). Достоверность различий определяли с помощью t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты. В полученных эякулятах объем в среднем составил $54,8 \pm 8,8$ мл, содержание сперматозоидов — $184,5 \pm 23,7$ млн/мл, активность — $4,4 \pm 0,3$ балла, выживаемость при температуре 2-4 °С — $125,2 \pm 8,4$ ч; после криоконсервации активность снизилась до $1,8 \pm 0,2$ балла, выживаемость — до $59,2 \pm 14,7$ ч. Доля морфологически нормальных сперматозоидов в нативной сперме достигала $71,4 \pm 4,4$ %, в криоконсервированной — $68,4 \pm 4,0$ %.

Доля (%) сперматозоидов с нормальной морфологией в свежеполученной и криоконсервированной эякулированной и эпидидимальной сперме жеребцов ($n = 5$, $\bar{X} \pm x$)

Морфологический признак	Эпидидимальная сперма		Эякулированная сперма	
	при получении	после оттаивания	при получении	после оттаивания
Интактная головка	76,1±4,2	64,4±6,1	73,6±4,2	57,2±7,3
Присутствие акросомы	98,5±0,5	92,6±1,3	98,0±0,7	89,1±1,9
Нормальное положение акросомы	99,2±0,8	98,2±1,6	98,4±0,7	91,8±3,7
Нормальная форма акросомы	94,4±1,6	87,8±2,9	91,6±1,5	87,0±2,9
Компактное содержимое акросомы	87,6±3,3	73,5±5,2	86,0±3,7	72,6±6,7
Нормальная форма ядра	99,6±0,2	97,3±1,2	98,3±1,3	93,7±3,3
Нормальные митохондрии	97,1±1,3	90,3±1,4	93,7±2,3	88,0±2,1
Нормальные аксонемы	91,5±2,3	84,7±4,5	88,3±2,9	84,8±4,1
Нормальные наружные плотные фибриллы	99,5±0,5	98,9±1,1	98,8±1,2	98,7±1,3
Нормальная фиброзная оболочка	100	99,0±1,1	100	98,0±2,0

Использование эякулированной и эпидидимальной спермы от одних и тех же жеребцов позволило сравнить повреждения половых клеток после криоконсервации в зависимости от способа отбора образцов. Один из основных показателей качества спермы, определяемых с помощью

электронной микроскопии, — количество сперматозоидов с интактными головками (рис. 1), имеющими нормальные акросомы, форму и хроматин ядра (18). В эпидидимальной сперме доля таких сперматозоидов составила 76,1 %, после эякуляции — снижалась на 2,5 % (табл.). При замораживании-оттаивании эякулированной спермы число сперматозоидов с интактными головками уменьшалось еще на 16,4 % и составило в среднем 57,2 %. В криоконсервированной эпидидимальной сперме количество сперматозоидов с интактными головками (64,4 %) было на 7,2 % выше, чем в замороженной эякулированной.

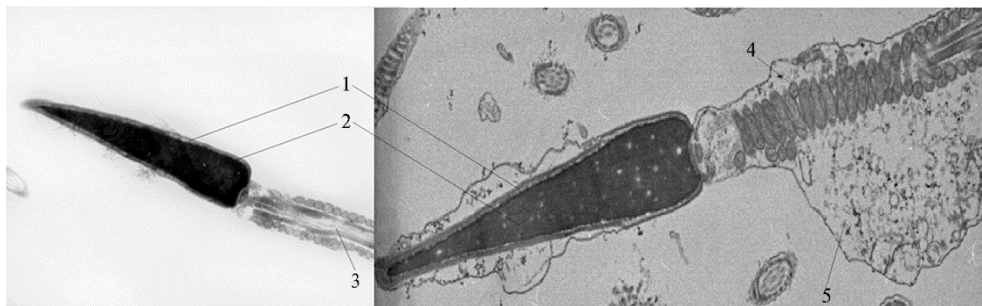


Рис. 1. Нормальный сперматозоид жеребца (слева) и сперматозоид с ассиметричной цитоплазматической каплей (справа): 1 — акросома, 2 — хроматин, 3 — продольный срез через акросому жгутика, 5 — цитоплазматическая капля. Электронный микроскоп Hitachi 700 (Япония), увеличение $\times 5000-25000$.

Из патологий головок сперматозоидов при получении и криоконсервации спермы отмечали увеличение числа сперматозоидов с деградацией акросомы в результате преждевременной акросомной реакции, с гипоплазией акросомы (некомпактное содержимое акросомы), изменениями формы ядра, вакуолизацией хроматина.

В основном при криоконсервации как эякулированной, так и эпидидимальной спермы жеребцов повреждалась акросома (рис. 2, 3). В эпидидимальной сперме она присутствовала у 98,5 % сперматозоидов, в эякуляте и после замораживания-оттаивания доля сперматозоидов с прореагировавшей акросомой (с деградацией акросомы) возрастала на 9,4 %. При замораживании и последующем оттаивании количество сперматозоидов с деградацией акросомы в эпидидимальной сперме увеличивалось на 5,9 % ($p < 0,05$), в эякулированной — на 8,9 % ($p < 0,01$).

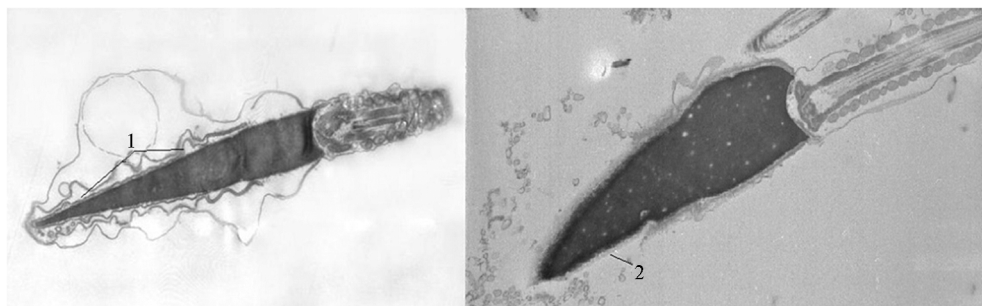


Рис. 2. Сперматозоид жеребца с «пустой» акросомой (слева) и сперматозоид с прореагировавшей акросомой (после прошедшей акросомной реакции) (справа): 1 — акросома с электронно-прозрачным содержимым («пустая») и неровными контурами, 2 — остаточный материал прореагировавшей акросомы. Электронный микроскоп Hitachi 700 (Япония), увеличение $\times 16000-18000$.

К наиболее распространенным патологиям при криоконсервации также относилось увеличение числа сперматозоидов с гипоплазией акро-

сом и отсутствием содержимого (акросомы с электронно-прозрачным содержимым). В криоконсервированном эякуляте доля сперматозоидов с некомпактным содержимым акросомы возрасла на 13,4 %, после замораживания и оттаивания эпидидимальной спермы — на 14,1 %.

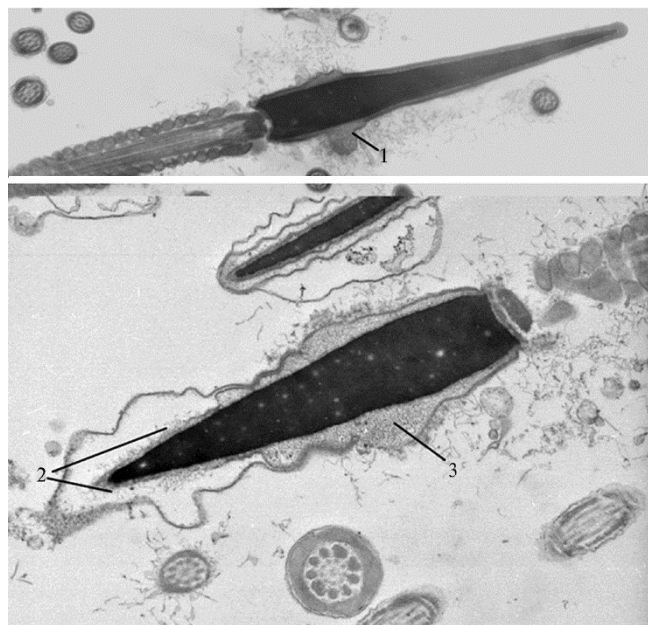


Рис. 3. Начальная стадия повреждения акросомы сперматозоида жеребца: 1 — зоны диффузного расширения акросомы с волокнистым содержимым, 2 — участок расширенной акросомы с электронно-прозрачным содержимым («пустая» акросома), 3 — участок расширенной акросомы с волокнистым содержимым. Электронный микроскоп Hitachi 700 (Япония), увеличение $\times 16000-18000$.

Матозоидов с поврежденными митохондриями увеличилось на 3,4 %, при криоконсервации — еще на 5,7 %, в результате митохондрии оказались повреждены у 9,1 % сперматозоидов. По росту числа аномалий митохондрий при криоконсервации эпидидимальной спермы по сравнению со свежеполученной достоверность различий была достаточно высока ($p < 0,05$).

Морфологические аномалии аксонемы тесно взаимосвязаны с низкой фертильностью и бесплодием (27). Поэтому исследование целостности аксонем — один из обязательных этапов при электронно-микроскопическом исследовании эякулята. Аксонема как у эпидидимальных, так и у эякулированных сперматозоидов оказалась весьма устойчива к криоконсервации. От получения спермы до ее замораживания и последующего оттаивания число сперматозоидов с аномальной формой жгутика увеличивается на 6,7 %, что существенно ниже аналогичного показателя для поврежденных митохондрий и особенно акросомы.

Наружные плотные фибриллы и фиброзная оболочка аксонемы сперматозоидов жеребцов тоже устойчивы к внешним воздействиям: как было показано, они практически не повреждаются ни при получении спермы, ни при замораживании-оттаивании.

В целом, результаты диагностики ультраструктурных аномалий в эпидидимальных и эякулированных спермиях продемонстрировали, что при получении спермы на искусственную вагину повреждения органоидов половых клеток минимальны, а основные структурные изменения происходят при криоконсервации. Подтверждение высокой сохранности эпиди-

Воздействие криоконсервации на ядро сперматозоидов было минимальным: изменения формы ядра отмечали при получении и криоконсервации спермы в среднем всего у 5,9 % клеток. В свежеполученной сперме сперматозоиды с вакуолизированным хроматином ядра не встречались, после криоконсервации их выявили в небольшом количестве (от 1,6 до 6,1 %) в образцах от двух жеребцов.

В эпидидимальной сперме доля сперматозоидов с нормальными митохондриями составила 97,1 %, в эякуляте — 93,7 %. Таким образом, при получении спермы и ее первичной обработке число спер-

димальных сперматозоидов, а также их устойчивости к криоконсервации позволяет сделать позитивный прогноз по разработке и применению технологии криоконсервации эпидидимальной спермы жеребцов.

Итак, ультраструктурная целостность органоидов в половых клетках жеребцов в эпидидимальной сперме выше, чем в эякулированной, однако эти различия недостоверны. В меньшей степени ультраструктурные повреждения сперматозоидов происходят при получении спермы, в большей — в процессе ее криоконсервации. При замораживании и оттаивании как эпидидимальной, так и эякулированной спермы наиболее уязвима акросома сперматозоидов, менее чувствительны митохондрии, тогда как аксонема, наружные плотные фибриллы и фиброзная оболочка аксонемы достаточно устойчивы, а воздействие на ядро сперматозоидов минимально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Науменкова В.А., Атрощенко М.М., Лебедева Л.Ф., Халилов Р.А., Рябова Т.Н. Изучение длительности сроков хранения семени жеребцов в состоянии анабиоза. Коневодство и конный спорт, 2013, 5: 15-17.
2. Лебедева Л.Ф., Атрощенко М.М., Бурмистрова С.А. Основные факторы, влияющие на результативность осеменения кобыл спермой, криоконсервированной по российским и зарубежным технологиям. Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(4): 476-485 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.4.476rus).
3. Науменков А.И., Романькова Н.К. Лактозо-хелато-цитратно-желточный разбавитель спермы жеребца. В сб.: Теория и практика совершенствования пород лошадей (научные труды ВНИИК, Дивово), 1971, XXV: 128-132.
4. Loomis P.R., Amann R.P., Squires E.L., Pickett B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. J. Anim. Sci., 1983, 56(3): 687-693 (doi: 10.2527/jas1983.563687x).
5. Martin J.C., Klug E., Gunzel A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J. Reprod. Fertil., 1979, 27: 47-51.
6. Atroshchenko M.M., Bragina E.E. Change in the ultrastructure of stallion spermatozoa under the effect of cryopreservation. Russian Agricultural Sciences, 2011, 37(2): 175-178 (doi: 10.3103/S1068367411020029).
7. Guimarães T., Lopes G., Ferreira P., Leal I., Rocha A. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. Anim. Reprod. Sci., 2012, 136: 85-89 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.028).
8. Parra-Forero L.Y., Mendoza G.D., Gyngora A., López Fernández M.D.C., Cruz L.A., Montiel A.J., Kjelland M.E., García-Contreras A.D.C. Azteca breed horse epididymal sperm evaluation: a comparison of head, corpus and cauda sperm quality. Advances in Reproductive Sciences, 2015, 3: 57-65 (doi: 10.4236/arsci.2015.33007).
9. Roels K., Leemans B., Ververs C., Govaere J., Hoogewijs M., Van Soom A. Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2014, 83: 321-325.
10. Magistrini M., Chanteloube Ph., Palmer E. Influence of season and frequent of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J. Reprod. Fertil., 1987, Suppl. 35: 127-133.
11. Kenney R.M., Hurtgen J.P., Pierson R., Witherspoon D., Simons J. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Journal of Society for Theriogenology, 1983, 9: 3-100.
12. Bielanski W., Kaczmarek F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. J. Reprod. Fertil., 1979, Suppl. 27: 39-45.
13. Hurtgen J.P., Johnson L.A. Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. J. Reprod. Fertil., 1982, Suppl. 32: 15-20.
14. Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). J. Am. Vet. Med. Assoc., 1990, 197: 389-394.
15. Angelopoulos T., Moshel Y.A., Lu L., Macanas E., Grifo J.A., Krey L.C. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. Fertil. Steril., 1998, 69: 740-747.
16. Colenbrander B., Gadella B.M., Stout T.A. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. Reprod. Domest. Anim., 2003, 38(4): 305-311 (doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x).

17. Pesch S., Bostedt H., Failing K., Bergmann M. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim. Reprod. Sci.*, 2006, 91(3-4): 285-298 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.004).
18. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. Электронно-микроскопическое изучение сперматозоидов человека и его роль в диагностике мужского бесплодия. *Проблемы репродукции*, 2000, 6: 62-71.
19. Amann R., Hamnerstedt R., Veeramachaneni D. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 1993, 5: 361-381.
20. Johnson L., Amann R., Pickett B. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, 41: 1190-1196.
21. Auger J., Dadoune J.-P. Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. *Biol. Reprod.*, 1993, 49(1): 166-175.
22. Cornwall G.A. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update*, 2009, 15: 213-227 (doi: 10.1093/humupd/dmn055).
23. Bruemmer J.E. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2006, 22: 677-682 (doi: 10.1016/j.cveq.2006.08.007).
24. Monteiro G., Papa F., Zahn F., Dellaqua J. Jr., Melo C., Maziero R., Avanzi B., Alvarenga M., Guasti P. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011, 127: 197-201 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.08.002).
25. Weiss R.R., Muradas P.R., Graneman L.C., Meira C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. *Animal Reproduction Science*, 2008, 107: 356 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.133).
26. Garcia-Macias V., Martinez-Pastor F., Alvarez M., Garde J.J., Anel E., Anel L., de Paz P. Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*, 2006, 66: 1921-1930 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.011).
27. Хаят С.Ш., Брагина Е.Е., Курило Л.Ф. Ультраструктурное исследование сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией. *Андрология и генитальная хирургия*, 2012, 4: 54-61 (doi: 10.17650/2070-9781-2012-4-54-61).

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: atomiks-77@mail.ru, amzaitceff@mail.ru;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова,
119992 Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40,
e-mail: bragor@mail.ru

Поступила в редакцию
30 декабря 2016 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 2, pp. 274-281

COMPARATIVE STUDY OF THE STRUCTURAL INTEGRITY OF SPERMATOZOA IN EPIDIDYMAL, EJACULATED AND CRYOPRESERVED SEMEN OF STALLIONS

M.M. Atroshchenko¹, V.V. Kalaschnikov¹, Ye.Ye. Bragina², A.M. Zaitsev¹

¹All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Divovo, Rybnovskii Region, Ryazan Province, 391105 Russia, e-mail atomiks-77@mail.ru, amzaitceff@mail.ru (corresponding authors);

²A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1/40, Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia, e-mail bragor@mail.ru

ORCID: Atroshchenko M.M. orcid.org/0000-0001-6023-0332

The authors declare no conflict of interests

Supported by Russian Science Foundation (project № 17-16-01109)

Received December 30, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.274eng

Abstract

Cryopreservation of semen is an important way to preserve genetic resources. It is the most actual in horse breeding than in other livestock industries, as currently in many horse breeds, especially unique domestic breeds, the number is approaching a critical level. For many native breeds due to a specific management, year-round outdoors in herds, it is impossible to obtain sperm for cryopreservation by a traditional method using an artificial vagina, and the only cost-effective way to create cryobanks is getting epididymal semen. The technology for cryopreservation of stallion semen includes some critical steps that are characterized by a decrease in sperm quality. These are proce-

ture for semen donation, dilution, temperature shock during freezing and thawing. For the first time a comparative transmission electron microscopy study of the ultrastructural integrity of spermatozoa was done for ejaculated and epididymal sperm in the same stallions thus avoiding the influence of different individuals on the compared parameter. Structural damage caused by cryoconservation of epididymal and ejaculated sperm was studied. It was found that acrosomes were the most susceptible and undergone the greatest impact. Its predominant pathology is the absence of internal contents (acrosome hypoplasia), resulted in enzyme deficiency. The frequency of this pathology was 12.4 % and 14.0 % for fresh epididymal and ejaculated sperm, respectively, and increased almost twofold after freezing and thawing, reaching 26.5 and 27.4 %, respectively. The rate of spermatozoa with the second most common pathology, acrosome degradation (premature release of sperm enzymes that dissolve the oocyte membrane, resulting in the loss of the ability to fertilize), after cryopreservation increased by 5.9 % ($p < 0.05$) and 8.9 % ($p < 0.01$) for epididymal and ejaculated semen, respectively. The nucleus of the sperm is one of the most resistant to cryopreservation among the organelles, though in two stallions we observed changes in the shape of the nucleus and vacuolation of chromatin after cryopreservation with a frequency of 1.6 to 6.1 %. Less than 10 % of the sperm had pathology of mitochondria. The axoneme of sperm is sufficiently resistant to cryopreservation. Outer dense fibers and fibrous membrane are almost not damaged during semen collecting as well as under semen freezing and thawing. Higher rates of ultrastructural integrity found for epididymal semen were not statistically significant. Thus, the sperm collecting results in minimal ultrastructural damage, whereas the main pathology is caused by cryopreservation. The ultrastructural integrity of spermatozoa in epididymal semen allow us to recommend this sperm collecting technique to organize cryobanks in case of impossibility of sperm collecting from stallions in traditional ways, or in need for early castration of stallions, in particular in sporting and productive horse breeding.

Keywords: stallion, electron microscopy, epididymal semen, ejaculated semen, cryopreservation.

Научные собрания

KEYSTONE SYMPOSIA — MONONUCLEAR PHAGOCYTES IN HEALTH, IMMUNE DEFENSE AND DISEASE

(30 April-4 May 2017, Austin, United States)

Organization: Steffen Jung and Miriam Merad

Disciplines: Life Science, Health Science

Subdisciplines: Immunology, Immunology

Mononuclear phagocytes (MNP) are immune cells that are uniquely equipped to sense and respond to environmental cues by promoting tissue homeostasis or initiating tissue repair and immunity. MNP also contribute significantly to tissue pathologies, and their manipulation holds considerable therapeutic potential. MNP display major functional specializations. Most macrophages are established before birth and perform tissue-specific functions in organ development and homeostasis. Short-lived classical dendritic cells (DC) are specialized in triggering adaptive T cell immunity. Monocytes complement macrophages and DC as highly plastic cells, in particular during inflammation. While MNP subsets have been identified, individual contributions to health and disease are not well-defined. Breathtaking technological advance in genomic profiling of populations and single cells is revealing the breadth of MNP functions and identifying molecular checkpoints for targeted therapeutic intervention. These molecular efforts are paralleled by astounding progress in imaging capabilities, enabling the study of the cells in their physiological context. This meeting therefore aims to: 1) Cover recent progress in the field, revealing novel and differential contributions of MNP in physiological processes, and identify critical knowledge gaps; 2) Stimulate scientific exchange, in particular between clinicians and researchers, to better translate findings from animal models into human settings and brainstorm regarding novel therapeutic intervention; and 3) Develop novel conceptual frameworks for future studies of MNP in health and disease.

Session Topics:

- Mononuclear Phagocyte Development
- Workshop 1: Monocytes, DC and Macrophages
- Mononuclear Phagocyte Maintenance
- Mononuclear Phagocytes at the Tissue Site
- Mononuclear Phagocytes in Gut Homeostasis and Inflammation
- Mononuclear Phagocyte Interactions with the Central and Peripheral Nervous System
- Workshop 2: Checkpoint Blockade and Vaccination Therapies
- Mononuclear Phagocytes, Inflammation and Therapy
- Mononuclear Phagocytes and Cancer Progression
- Mononuclear Phagocytes and Cancer Treatment

Контакты и информация: <http://www.globaleventslist.elsevier.com/events/2017/04/keystone-symposia-mononuclear-phagocytes-in-health-immune-defense-and-disease/>