

ХАРАКТЕР КРИСТАЛОУТВОРЕННЯ ПЛАЗМИ СПЕРМИ ЗА РІЗНОГО РІВНЯ ТЕСТОСТЕРОНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ

Встановлено, що внаслідок зниження рівня тестостерону в сироватці крові кнурів-плідників знижується концентрація фруктози плазми сперми, що вказує на їх тісний взаємозв'язок. Різні рівні зниження тестостерону та фруктози зумовлювали різні ступені порушення фізико-хімічних властивостей плазми сперми, що відобразалося на характері кристалоутворення плазми та обумовило зниження якості сперми кнурів-плідників і заплідненості свиноматок. Метод визначення кристалізації плазми сперми кнурів-плідників має діагностико-прогностичне значення.

Постановка проблеми. Сперма ссавців – це складна біологічна суспензія, яка виділяється під час еякуляції та складається із сперміїв і рідкої частини – плазми сперми [8]. Остання є продуктом синтезу і секреції сім'яників, їх придатків та придаткових статевих залоз (уретральних, міхурцеподібних, передміхурової й цибулліних), функціональний стан та секреторна активність яких залежать від рівня тестостерону в сироватці крові. Об'єм плазми сперми у кнурів-плідників складає 90–95 % від об'єму еякуляту й залежить від функціонального стану статевих та придаткових залоз [6, 14]. Об'єм та фізико-хімічний склад плазми може варіювати в окремих еякулятах плідників та впливати на якість сперми.

За нормальної функціональної активності сім'яників та придаткових статевих залоз плазма сперми містить оптимальні співвідношення поживних речовин. Вони забезпечують розрідження, енергетичне живлення сперміїв, стабілізацію процесів їх життєдіяльності, попередження пошкодження, ізотонічність, буферність і електролітний склад, осмотичний тиск та реакцію (рН) середовища, в якому перебувають спермії після еякуляції, що значною мірою впливає на рухливість, виживаність *in vivo*, *in vitro* та запліднюючу здатність [10, 11, 12].

Через ендокринні порушення, хвороби статевих органів самців відбуваються розлади сперміогенезу, що проявляється зміною або гальмуванням функцій статевих і придаткових залоз, фізико-хімічного складу плазми сперми, зокрема, зменшенням рівня фруктози й лимонної кислоти в 1,5–2 рази, порушенням білкового, макро- та мікроелементного складу [1, 6, 13] з одночасним зниженням (на 40–50 %) показників якості сперми [3, 6].

Плазма сперми є полікомпонентною біологічною рідиною, тому навіть незначні порушення функціональної активності статевих та придаткових залоз зумовлюють зміни її фізико-хімічного складу, що відображається на показниках

якості сперми та заплідненості самок. Найпростішим та інформативним методом оцінки фізико-хімічних властивостей полікомпонентних біологічних рідин є кристалографічний метод. В його основі лежить взаємодія іонів, молекул та атомів біологічної рідини з кристалоутворюючим середовищем або базисною речовиною [2, 9].

Аналіз останніх досліджень та постановка завдання

Процес кристалоутворення в біологічних рідинах є інтегральним показником їх фізико-хімічних властивостей та може відображати їх норму або патологію (ступінь порушення), оскільки численні компоненти, що входять до складу плазми сперми, за відповідних умов структуруються у певному порядку, утворюючи специфічні кристалічні форми [4, 5]. Зокрема, за характером кристалізації плазми сперми можна оцінювати функціональну активність статевих та придаткових статевих залоз [4, 7].

Наразі відомо, що передміхурова та міхурцеподібні залози є андрогензалежними органами, функціональна та секреторна активність яких регулюється гонадотропними та статевими гормонами. Насамперед, функція периферійної зони передміхурової залози регулюється тестостероном, який проникає в клітини залози шляхом дифузії та під впливом ферменту 5 α -редуктази метаболізується в більш активний метаболіт – дигідротестостерон (ДГТ). Останній зв'язується зі специфічними рецепторами клітин, проникає в їх ядро та сприяє активації синтезу і секреції специфічних ферментів, білків тощо. Секреторний епітелій сім'яних міхурців міхурцеподібних залоз також функціонує під впливом тестостерону і ДГТ, синтезуючи фруктозу, простагландини та інші поживні речовини. Фруктоза є головним енергетичним джерелом для спермій, яка забезпечує та підтримує метаболічні процеси, впливає на їх рухливість і виживаність, а її рівень у плазмі сперми є індикатором синтезу тестостерону інтерстиціальними ендокриноцитами (клітинами Лейдига). Гальмування функціональної активності міхурцеподібних залоз супроводжується зниженням вмісту везикулярного секрету в плазмі сперми, що зумовлює порушення співвідношення біологічно активних речовин та знижує запліднюючу здатність сперми.

З метою визначення фізико-хімічних властивостей плазми сперми, оцінки функціонального стану придаткових статевих залоз, ефективності лікування, прогнозу подальшого використання чи обґрунтування причин вибраковування бугаїв-плідників у ветеринарній медицині, в якості діагностичного лабораторного тесту використовують кристалографічний метод [6].

Мета і завдання дослідження

Оскільки за структурними характеристиками кристалоутворення плазми сперми можна своєчасно та об'єктивно визначити функціональний стан статевих і придаткових залоз, то метою наших досліджень було вивчення характеру

кристалізації плазми сперми кнурів-плідників залежно від показників якості сперми, рівня тестостерону в сироватці крові та фруктози у плазмі сперми.

Об'єкти та методика досліджень

Об'єктом для дослідження була сперма кнурів-плідників 10–24-місячного віку, породи *ландрас* та *велика біла*, які належали ННДЦ Білоцерківського НАУ, ДП "Кліринг-Агро" та ТОВ АФ "Глушки". Після взяття еякуляту оцінку якості сперми кнурів-плідників проводили згідно з інструкцією із штучного осіменіння свиней за об'ємом еякуляту, рухливістю, концентрацією та виживаністю спермій, реакцією середовища (рН), кількістю патологічних форм та мертвих спермій, заплідненістю свиноматок. Рівень тестостерону в сироватці крові визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а концентрацію фруктози у плазмі сперми – методом Рое. Групи кнурів формували залежно від показників якості їх сперми: контрольна група (n=11) – плідники з нормальними показниками якості сперми; 1-а дослідна (n=5) – плідники, в яких виживаність спермій була нижчою фізіологічних коливань; 2-а дослідна група (n=4) – кнури, в яких виживаність спермій була нижчою допустимих норм та кількість патологічних форм і мертвих спермій була вищою фізіологічних норм; 3-я дослідна група (n=5) – тварини, у яких всі показники якості сперми яких не відповідали вимогам інструкції зі штучного осіменіння свиней.

Плазму отримували шляхом центрифугування нативної сперми протягом 10 хвилин за 3 000 об/хв. Приготування висушеної краплі плазми сперми (біосубстрату) проводили таким чином: краплю плазми скляною паличкою наносили на чисте, сухе, знежирене предметне скло та додавали рівний об'єм 0,9 %-ного розчину натрію хлориду (NaCl). Краплі змішували скляною паличкою таким чином, щоб діаметр суміші складав не більше 10 мм. Препарати висушували за температури 20–22°C впродовж доби. Світлову мікроскопію проводили за збільшення $\times 120$ та $\times 300$ разів, оцінюючи кристалографічну картину висушеної краплі плазми сперми за структурними характеристиками кристалоутворення: структурою та текстурою сформованих кристалів (повноцінністю сформованих кристалів); кількістю центрів кристалізації; впорядкованістю структури кристалів; формою кристалів; щільністю їх розташування; наявністю різних модифікацій кристалів та ступенем їх деформації, вмістом аморфних включень.

Результати досліджень. У кнурів-плідників контрольної групи вміст тестостерону в сироватці крові становив $17,9 \pm 0,9$ нмоль/л, рівень фруктози у плазмі сперми $3,2 \pm 0,2$ ммоль/л, при цьому показники якості їх сперми (табл. 1) характеризувалися нормальними значеннями.

У кнурів 1-ї дослідної групи, порівняно з контрольною, вміст тестостерону та фруктози були нижчими в 1,2 раза (рис. 1, 2). Водночас, вони мали вірогідно нижчі рухливість сперматозоїдів – на 7,6 % ($p < 0,01$), виживаність – на 25 % ($p < 0,01$) і заплідненість – на 34,6 % ($p < 0,01$). Решта показників якості їх сперми була в межах фізіологічних коливань (табл. 1).

У тварин 2-ї дослідної групи рівні тестостерону і фруктози були нижчими в 1,6 ($p<0,01$) і 1,3 ($p<0,05$) рази відповідно, а показники якості їх сперми були вірогідно нижчими за рухливість сперміїв – на 14,1 % ($p<0,05$), виживаністю – на 48,1 % ($p<0,001$) та концентрацією – на 39,8 % ($p<0,001$). Кількість морфологічно неповноцінних форм і мертвих сперміїв була вірогідно більшою. Заплідненість свиноматок при цьому знижувалася на 53,9 % ($p<0,001$) порівняно з контрольною групою.

Рівень тестостерону і фруктози у тварин 3-ї дослідної групи був вірогідно нижчим у 2,7 ($p<0,001$) і 1,7 ($p<0,01$) рази відповідно, порівняно з плідниками контрольної групи. Також нижчою була і якість їх сперми, зокрема, об'єм еякуляту на 33,5 % ($p<0,05$), рухливість на 68,8 % ($p<0,05$), концентрація на 76,9 % ($p<0,001$), виживаність сперміїв на 76,4 % ($p<0,01$), а вміст патологічних форм сперміїв – вищим на 65,3 %, мертвих – на 61,9 %.

Таблиця 1. Показники якості сперми кнурів-плідників (M±m)

Показники	Група тварин			
	Контрольна, n=11	1-а дослідна, n=5	2-а дослідна, n=4	3-я дослідна, n=5
Об'єм, мл	284,2±14,9	291,5±25,0	251,7±52,2	189,0±29,1*
Рухливість, %	90,2±1,7	83,3±1,4**	77,5±4,8*	28,1±27,6*
Концентрація, млн/мл	308,0±23,8	288,4±34,2	185,3±13,7***	71,0±46,2***
Вживаність, % (терморезистентна проба)	70,0±1,9	52,5±3,9**	36,31±7,3***	16,3±15,8**
pH	7,40±0,03	7,25±0,04*	7,36±0,16	7,43±0,15
Кількість патологічних форм сперміїв, %	5,2±0,7	12,0±2,4*	16,0±0,6***	15,0±12,5
Кількість мертвих сперміїв, %	6,5±0,8	7,1±0,5	16,1±2,4**	16,9±11,9
Заплідненість, %	81,4±2,8	53,2±6,9**	37,5±0,0***	0

Примітка. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, порівняно з контрольною групою тварин.

Рівень тестостерону і фруктози у тварин 3-ї дослідної групи був вірогідно нижчим у 2,7 ($p<0,001$) і 1,7 ($p<0,01$) рази відповідно, порівняно з плідниками контрольної групи. Також нижчою була і якість їх сперми, зокрема, об'єм еякуляту на 33,5 % ($p<0,05$), рухливість на 68,8 % ($p<0,05$), концентрація на 76,9 % ($p<0,001$), виживаність сперміїв на 76,4 % ($p<0,01$), а вміст патологічних форм сперміїв – вищим на 65,3 %, мертвих – на 61,9 %.

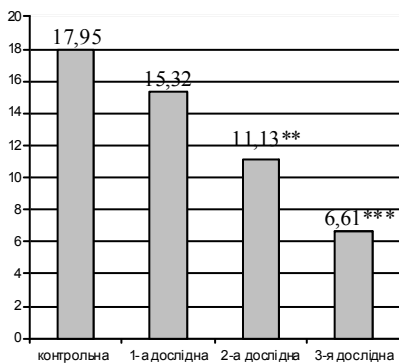


Рис. 1. Рівень тестостерону в сироватці крові кнурів (нмоль/л) ($p < 0,01$, *** $p < 0,001$, порівняно з контрольною групою тварин)**

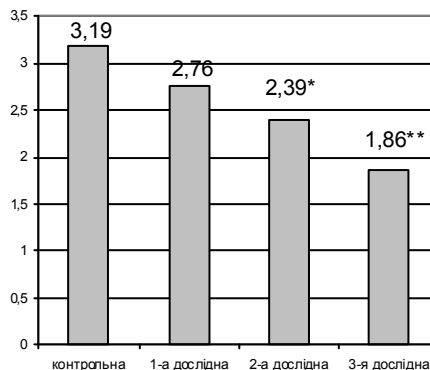


Рис. 2. Рівень фруктози в плазмі сперми кнурів (ммоль/л) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, порівняно з контрольною групою тварин)

За результатами мікроскопічного дослідження препаратів висушеної краплі плазми сперми кнурів-плідників **контрольної групи** процес кристалоутворення характеризувався утворенням великої кількості центрів, які повноцінно формувалися, структуризувалися за рахунок біологічної повноцінності біосубстрату. Сформовані кристали щільно розташовувалися один до одного по всій площі краплі (рис. 3). Структура кристалів плазми сперми кнурів контрольної групи мала впорядковану будову: центральні осі кристалів перетиналися під прямим кутом, унаслідок чого вони мали хрестоподібну форму. Товщина центральних і бокових розгалужень однакова, але центральні осі довші за бокові гілки (рис. 4). Формування і ріст останніх відбувався перпендикулярно, унаслідок чого вони рівномірно розгалужувалися від центральних, що надавало кристалам цілісної текстури (рис. 5), а рисунок кристалізації при цьому мав типовий феномен "листя папороті" (рис. 3–5).



Рис. 3. Щільне розташування кристалів у плазмі сперми кнурів контрольної групи. Зб. $\times 120$

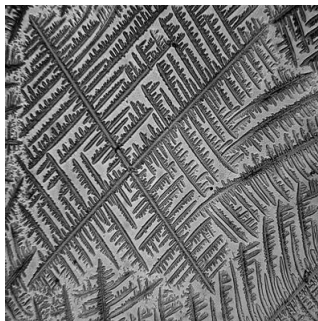


Рис. 4. Цілісна структура та хрестоподібна форма кристалів у вигляді “листя папороті” у плазмі сперми кнурів контрольної групи. Зб. $\times 300$

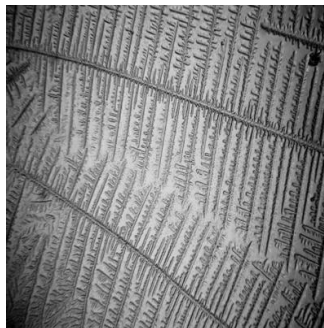


Рис. 5. Рівномірне розгалуження бокових гілок у плазмі сперми кнурів контрольної групи. Зб. $\times 300$

Процес кристалоутворення плазми сперми кнурів-плідників *1-ї дослідної групи* мав окремі незначні порушення. Кристалізація біосубстрату характеризувалася зменшенням кількості центрів кристалізації по всій площі висушеної краплі, деформацією центральних осей та бокових розгалужень у вигляді їх потоншення та потовщення (рис. 6). Бокові розгалуження відбувалися під різними кутами нахилу, що сприяло порушенню хрестоподібної форми кристалів та їх типової папоротеподібної структури (рис. 6–8). Разом з цим, місцями спостерігалися відсутність формування, росту і структуризації бокових розгалужень (рис. 7–8).



Рис. 6. Порушення структуризації кристалів у плазмі сперми кнурів 1-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$



Рис. 7. Деформація кристалів у плазмі сперми кнурів 1-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$



Рис. 8. Відсутність та порушення формування бокових розгалужень у плазмі сперми кнурів 1-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$

У плазмі сперми кнурів *2-ї дослідної групи*, порівняно з контрольною, спостерігали більш виражене порушення кристалотворення, що характеризувалося зменшенням кількості центрів кристалізації, унаслідок чого кристали розміщувалися на більшій відстані один від одного по всій площі препарату. Відмічалось порушення формування, росту та структуризації кристалів, що зумовлювали порушення повноцінності їх структури. Разом з цим, спостерігалися різні деформації текстур кристалів у вигляді зірчастих модифікацій (рис. 9). Місцями виявляли кристали зі значним потовщенням центральних гілок та бічних розгалужень, а подекуди – кристали у вигляді окремих деформованих, грубих, безформних, сильно потовщених утворень (рис. 10), в яких погано виражені або зовсім відсутні бокові розгалуження. Унаслідок таких структурних змін у плазмі сперми кнурів порушувався характерний феномен ”листя папороті“ (рис. 11).



Рис. 9. Деформація текстур кристалів по всій площі висушеної краплі плазми сперми кнурів 2-ї дослідної групи. Зб. ×300



Рис. 10. Наявність деформованих, грубих, безформних кристалів у плазмі сперми кнурів 2-ї дослідної групи. Зб. ×300



Рис. 11. Деформація кристалів та порушення папоротеподібної їх структури у плазмі сперми кнурів 2-ї дослідної групи. Зб. ×300

Процес кристалотворення плазми сперми кнурів *3-ї дослідної групи*, порівняно з контрольною групою тварин, характеризувався значно вираженим порушенням. Спостерігалось гальмування формування центрів кристалізації та порушення структуризації і росту кристалів. Унаслідок цього уся площа висушеної краплі плазми містила лише поодинокі, значно деформовані (рис. 12), грубі, модифіковані утворення або тільки сліди кристалізації (рис. 13). Проте, збільшувалась кількість аморфних включень, які хаотично займали всю площу препаратів (рис. 13, 14).

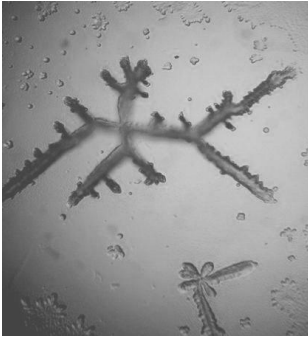


Рис. 12. Поодинокі, значно деформовані кристали плазми сперми кнурів 3-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$



Рис. 13. Грубі, модифіковані утворення у плазмі сперми кнурів 3-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$



Рис. 14. Сліди кристалізації та аморфні включення у плазмі сперми кнурів 3-ї дослідної групи. Зб. $\times 300$

Нейроендокринні розлади системи гіпоталамус–гіпофіз–сім'яники–придаткові статеві залози, хвороби інфекційного й неінфекційного генезу сприяють зниженню біологічної повноцінності сперми, що відображається на її фізико-хімічних властивостях та супроводжується низькою запліднюючою здатністю [1, 3, 4, 6, 7, 10–14].

Таким чином, нормальна функціональна активність статевих і придаткових залоз кнурів-плідників контрольної групи забезпечувалася високими рівнями тестостерону в сироватці крові та фруктози у плазмі сперми тварин, що, у свою чергу, забезпечувало нормальну якість їх сперми. При цьому, кристалоутворення плазми характеризувалося чіткою структурною організацією кристалів та проявлялося наявністю типового феномену "листя папороті", що вказувало на високу біологічну повноцінність плазми.

У кнурів дослідних груп простежувалася чітка закономірність: разом із зменшенням рівня тестостерону в сироватці крові, знижувався рівень фруктози у плазмі сперми та, відповідно, погіршувалися показники якості їх сперми. Разом з цим, спостерігалися зміни структурної організації формування й росту кристалів на різних рівнях.

Так, у кнурів 1-ї дослідної групи за незначного зниження рівня тестостерону в сироватці крові й фруктози у плазмі сперми, якість їх сперми знижувалася лише за деякими показниками. Водночас, характер кристалізації плазми мав окремі незначні порушення, проте типовий феномен "листя папороті" був збережений. Це вказує на незначне зниження функціональної активності статевих та придаткових залоз. Усі ці фактори сприяли зниженню заплідненості свиноматок, яка складала лише 53,2 %.

У кнурів 2-ї дослідної групи рівень тестостерону був нижчим у 1,6, а фруктози в 1,3 раза, що, відповідно, зумовлювало зниження всіх показників якості сперми. Разом з цим, спостерігалось більш виражене порушення структурної організації кристалоутворення, яке характеризувалося переважно утворенням деформованих кристалів та зміною їх папоротеподібної структури. На нашу думку, ці зміни були зумовлені більш вираженим порушенням функціональної активності статевих і придаткових залоз. Зміни біологічної повноцінності сперми призводили до зниження заплідненості свиноматок, яка при цьому складала лише 37,5 %.

За екстремального зниження рівня тестостерону в 2,7 та фруктози в 1,7 раза у кнурів 3-ї дослідної групи якість їх сперми не відповідала вимогам інструкції із штучного осіменіння свиней, унаслідок чого сперма цих кнурів вибраковувалася. Одночасно спостерігали глибокі порушення структурної організації кристалоутворення, які характеризувалися відсутністю утворення центрів кристалізації та наявністю грубих і аморфних включень. Це було зумовлено різким послабленням секреторної та синтезувальної функції статевих й придаткових залоз, унаслідок чого знижувалася біологічна повноцінність плазми сперми та порушувалися її фізико-хімічні властивості.

Таким чином, за характером структурної організації кристалів (кристалографічною картиною) у плазмі сперми кнурів-плідників можна діагностувати глибину порушень її фізико-хімічних властивостей та біологічної повноцінності.

Висновки

1. Зниження рівня тестостерону в сироватці крові кнурів-плідників супроводжується зменшенням вмісту фруктози у плазмі сперми та зниженням показників якості сперми.

2. Характер порушення кристалізації плазми сперми у кнурів залежить від рівня тестостерону в сироватці крові та вмісту фруктози у плазмі сперми. За різних ступенів зниження рівнів тестостерону і фруктози відбуваються відповідні порушення процесів кристалоутворення у плазмі сперми.

3. Метод кристалізації плазми сперми кнурів-плідників має діагностико-прогностичне значення. Його можна широко використовувати у виробничих умовах в якості лабораторного тесту для контролю відтворної функції кнурів.

Перспективами подальших досліджень є вивчення впливу різних методів корекції якості сперми кнурів-плідників на характер кристалоутворення плазми сперми.

Література

1. Вивчення дії аміноцукору глюкозаміна гідрохлориду на перебіг експериментального скипидарного простатиту / Г.В. Зайченко, Л.В. Яковлева,

С.А. Гращенкова [та ін.] // Український біофармацевтичний журнал. – Харків, 2008. – Т.1. – № 1. – С. 16–21.

2. Камакин Н.Ф. Дифференциальная тизиграфия: потенциальная значимость при оценке физиологических и патологических состояний организма человека / Н.Ф. Камакин // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4. – Приложение 1. – С. 183–186.

3. Крячко В.Т. Некоторые физико-химические показатели спермы хряков / В.Т. Крячко // Ветеринария. – 1983. – № 4. – С. 47–49.

4. Літус О.І. Діагностика хронічного уретропростатиту за допомогою феномену кристалізації / О.І. Літус // Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2005. – № 1. – С. 82–85.

5. Мартусевич А.К. Исследование кристаллогенеза биосубстратов как способ раскрытия их информационной емкости / А.К. Мартусевич // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 9. – С. 85–86.

6. Святовец Г.Д. Физико-химический метод оценки качества плазмы спермы быков-производителей / Г.Д. Святовец // Ветеринария. – 1990. – № 10. – С. 39–40.

7. Скидан Н.И. Структурные характеристики жидкокристаллических фаз секрета предстательной железы при простатите хламидийной этиологии / Н.И. Скидан, Е.В. Кононенко, В.А. Аковбян // Вестник дерматологии и венерологии. – 1998. – № 1. – С. 11–14.

8. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных / Н.П. Шергин. – М.: Колос, 1967. – 239 с.

9. Экспериментальное исследование кристаллизации биологических жидкостей / Л.В. Бельская, О.А. Голованова, Е.С. Шукайло [и др.] // Вестник ОНЗ РАН. – Омск, 2011. – Том. 3 – С. 142–145.

10. Boar spermatozoa in the oviduct / H. Rodriguez-Martinez, F. Saravia, M. Wallgren [et al.] // Theriogenology. – 2005. – Vol. 63. – P. 514–525.

11. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa / J. Caballero, J.M. Vazquez, F.M. Garsia [et al.] // Theriogenology. – 2008. – Vol. 70(8). – P. 1352–1355.

12. Manaskova P. Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa / P. Manaskova, V. Jonakova // J. Reprod. Immunol. – 2008. – Vol. 78(1). – P. 40–48.

13. Nadermann E. Hexosamine content of normal and pathological human sperm / E. Nadermann, H.P. Nissen, H.W. Kreysel // Andrologia. – 1983. – Vol. 15(6). – P. 55–68.

14. Valuable boar sperm parameters when searching for freezability traits / L. Casas, S. Sancho, M. Briz [et al.] // Theriogenology. – 2008. – Vol. 70. – P. 1396–1397.
