

УДК 619:636.2:612.621

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-37-42>

Зайцева В.В., кандидат биологических наук, доцент

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ И ГУМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ РАЗБАВИТЕЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКА И ЧЕЛОВЕКА

Резюме

В ходе проведенной экспериментальной работы было установлено, что концентрация фосфолипидов и водного раствора активированного гумата калия оказывает влияние на жизнеспособность спермиев быка и человека.

Фосфолипиды, включенные в состав разбавителя до 10,0 и 20,0 мг, сохраняют через 5 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ выживаемость спермиев быка и человека у $34,4\pm 0,86$ – $35,5\pm 0,86$ % и $36,2\pm 0,86$ – $32,4\pm 0,86$ % половых клеток соответственно.

Разбавители, содержащие 0,0025%-ный водный раствор активированного гумата калия и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, обеспечивают наиболее высокую выживаемость относительно исходного показателя у спермиев быка и человека – до 72,9–78,8 % и 73,4–76,2 % соответственно.

Ключевые слова: сперма, фосфолипиды, гуминовые препараты, биологические показатели, разбавитель, инкубация.

Summary

In the course of the experimental work, it was found that the concentration of phospholipids and an aqueous solution of activated potassium humic substances affects the viability of bovine and human sperm.

Phospholipids included in the composition of the diluent up to 10.0 and 20.0 mg, after 5 hours of incubation at a temperature of $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, provide the survival rate of bull and human sperm at 34.4 ± 0.86 – 35.5 ± 0.86 % and 36.2 ± 0.86 – 32.4 ± 0.86 % germ cells, respectively.

Diluents containing 0.0025 % aqueous solution of activated potassium humate and 10.0 and 20.0 mg of phospholipids provide the highest survival rate relative to the baseline in bovine and human spermatozoa, respectively, up to 72.9–78.8% and 73.4–76.2 %.

Keywords: sperm, phospholipids, humic preparations, biological parameters, diluent, incubation.

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Липиды относятся к классу важнейших в биологическом отношении веществ. Огромный интерес к изучению липидов в организме связан с установлением их регуляторной, защитной и энергетической функции.

Фосфолипиды играют роль не только пластических соединений, но и являются функционально активными веществами. Они регулируют многие ферментные реакции (окислительное фосфорилирование), участвуют в транспортировке минеральных веществ и органических соединений через

биологические барьеры, играют определенную роль в возникновении процессов возбуждения и торможения и других физиологических явлений [6, 8, 9].

В состав фосфолипидов входят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и их альдегиды, фосфорная кислота, глицерин, инозит, сфингозин, холин, этаноламин и серин [1].

Главные составные части спермиев – белки и липиды. Согласно имеющимся данным лецитин является одним из основных компонентов биологических мембран клеток. Главное отличие спермиев от

других клеток – их способность к активному движению за счет энергии дыхания и гликолиза. Дыхание – основной биохимический процесс, обеспечивающий спермиев необходимой для движения энергией (около 90 % всей энергии) за счет окисления углеводов, липидов (фосфолипиды), простых сахаров и белков.

Фосфолипиды способствуют устранению нарушения клеточной мембраны с восстановлением функций у сперматозоидов (J. Graham, R. Foote, 1987). Также показано, что фосфолипиды требуются сперматозоидам для нормальной подвижности (G. Haidl с соавт., 1993). Нарушение фосфолипидного бислоя мембран спермиев может привести к изменению морфологии и жизнеспособности клеток.

Изучение биохимии липидов имеет практическую значимость, так как они могут быть использованы при разработке новых разбавителей для спермы и методов длительного хранения спермиев.

Развитие метода сохранения спермы животных связано главным образом с поиском более эффективных биологически активных веществ и защитных сред для сохранения гомеостаза и развития адаптивных процессов спермиев вне организма, что реализуется путем применения различных синтетических сред [4, 5, 7].

Так, ряд ученых изучали влияние гуминовых соединений торфа на живые клетки простейших и птицы [2, 3]. Они отмечали, что физиологически активные вещества торфа оказывают положительное мембранотропное действие на лимфоциты периферической крови цыплят, модулируя действие экзогенного интерферона.

Также в предварительных опытах нами было установлено позитивное влияние гуминовых соединений торфа в процессе разбавления спермы быка и человека на подвижность спермиев.

В соответствии с вышеприведенной информацией представляет научно-практический интерес оценка влияния разных концентраций гуминовых соединений и фосфолипидов на биологическую активность спермиев в составе разбавителя.

Цель работы – изучить влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по гуминовым соединениям, на биологические свойства спермиев быка и человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы спермы быка, представленные РПСУП «Витебское племпредприятие» кафедре акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения УО ВГАВМ для проведения учебного процесса и научно-исследовательской работы. Также в отдельных опытах для сравнительного анализа использовали образцы спермы человека с целью дальнейшего использования полученных результатов.

В опыте использовали по 3 образца спермы быка и человека, однородных по подвижности (7,3–7,5 баллов, или 71–72 %). Оценку образцов спермы осуществляли по нижеописанным методикам и согласно ГОСТ 32277-2013.

Полученные эякуляты до проведения опытов хранили в течение 1 ч при температуре (18 ± 2) °С. Критерии оценки опытных образцов в момент получения (за 1 ч до проведения опыта) следующие: сперма быка – цвет молочно-белый, консистенция сливообразная, объем эякулята 6,8–8,2 мл, концентрация спермиев 7,2–8,2 млрд/см³; сперма человека – цвет молочный, слегка опалесцирует, консистенция густая и вязкая, объем эякулята 2,5–2,8 мл, концентрация спермиев 0,015–0,018 млрд/см³.

Разбавители для спермы хранили не более 2 ч до момента использования. Температура разбавителей в момент разбавления спермы составила (37 ± 1) °С. Образцы спермы с опытными разбавителями в соотношении 1:9 разливали во флаконы, подогревали смесь на водяной бане до температуры (37 ± 1) °С и помещали в термостат на хранение при данном температурном параметре.

Подвижность спермиев определяли после получения спермы, а также через 1 ч после ее получения и хранения при темпе-

ратуре (18±2) °С до разведения разбавителями. Далее подвижность спермиев определяли через 5, 60, 120, 180, 240 и 300 мин после разведения образцов спермы быка и человека опытными разбавителями при температуре (37±1) °С.

Опытную работу проводили в лаборатории кафедры акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения УО ВГАВМ и ООО «Мир Здоровья».

В работе использовали материалы и реактивы: глюкоза; натрий лимоннокислый трехзамещенный; вода очищенная; 5%-ный раствор фосфолипидов ненасыщенных; 5%-ный водный раствор активированного гумата натрия (АГН) из высокоминерализованного низинного торфа (опытный образец); 5%-ный водный раствор активированного гумата калия (АГК) из высокоминерализованного обогащенного низинного торфа (опытный образец); 1%-ный водный раствор активированного гумата аммония (АГА),

приготовленный из препарата «Оксидат торфа»; 1%-ный препарат БСТ (биологический стимулятор торфа); аммиак водный 25%-ный; натрия гидроксид; эфир петролейный марки 40–70; необходимое лабораторное оборудование.

В образцах спермы и их смесях с разбавителями проводили исследования по определению концентрации спермиев в счетной камере; определению подвижности спермиев; определению количества живых/мертвых спермиев, дифференцированных окрашиванием; определению выживаемости спермиев при температуре (37±1) °С в течение 0–5 ч.

Для исследования одного состава разбавителя использовали 0,35 см³ эякулята каждого образца спермы, разведенного 1:9.

В исследованиях использовали приготовленные нами опытные составы разбавителя спермы (таблица 1).

Таблица 1. – Опытные составы разбавителя спермы

Компоненты	Опытные составы														
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12	№ 13	№ 14	№ 15
Глюкоза, %	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Натрий лимоннокислый трехзамещенный, %	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
Фосфолипиды, мг	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0
АГН, %	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-
АГК, %	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-	-	-	-
АГА, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-
БСТ, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025
Вода очищенная, %	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе проведенной экспериментальной работы было установлено, что кон-

центрация фосфолипидов оказывает влияние на жизнеспособность спермиев быка и человека (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГН, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Подвижность спермиев (%) до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,8±1,93	68,9±1,93	70,8±1,93	71,2±1,93	71,0±1,93	70,6±1,93
через 60 мин	59,4±1,29	62,5±1,5	61,5±1,5	63,2±1,5	62,8±1,5	63,4±1,7
через 120 мин	47,8±1,29	56,6±1,5	57,0±1,5	54,0±1,5	57,4±1,5	56,2±1,5
через 180 мин	36,3±0,86	48,7±1,1	49,4±1,1	46,0±1,1	50,2±1,1	51,6±1,1
через 240 мин	27,7±0,6	41,4±0,86	40,3±0,86	37,2±0,86	46,4±1,1	47,7±1,1
через 300 мин	21,4±0,6	35,5±0,86	34,4±0,86	31,4±0,86	42,2±0,86	40,4±0,86

Из таблицы 2 видно, что наиболее высокая выживаемость спермиев быка отмечается в разбавителях № 2 и № 3, содержащих 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, составляет 35,5±0,86 и 34,4±0,86 % соответственно. Однако разбавители, содержащие 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов и 0,0025 % АГН, обеспечивали выживаемость спермиев после их инкубации в течение 5 ч при температуре (37±1) °С у 42,2±0,86 и 40,4±0,86 % соответственно, а относитель-

но исходного показателя – до 56,4–58,9 %.

Во втором опыте изучено влияние разных концентраций фосфолипидов, АГК и АГА в составе разбавителя на биологические показатели спермиев быка. Из таблицы 3 видно, что разбавители, содержащие в составе 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, сохраняли живучесть у 52,2±1,1 и 56,4±1,1 % образцов соответственно, а относительно исходного показателя – до 72,0–78,8 %.

Таблица 3. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГК и АГА, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12
Подвижность спермиев (%) до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,2±1,93	69,8±1,93	69,6±1,93	67,8±1,5	69,2±1,93	69,0±1,93
через 60 мин	58,6±1,5	68,5±1,5	67,6±1,5	55,2±1,5	60,4±1,5	58,4±1,5
через 120 мин	52,2±1,5	66,6±1,29	64,2±1,5	43,0±0,86	46,4±1,29	48,0±1,1
через 180 мин	46,2±1,1	63,6±1,1	61,6±1,29	34,4±0,86	36,6±0,86	36,4±0,86
через 240 мин	40,0±0,86	60,3±1,1	58,4±1,29	26,6±0,6	27,4±0,6	26,4±0,6
через 300 мин	33,5±0,86	56,4±1,1	52,2±1,1	10,6±0,6	22,2±0,6	20,6±0,6

Также видно, что разбавители № 11 и № 12, содержащие 0,0025 % АГА и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, через 5 ч инкубации при температуре (37±1) °С сохраняли жизнеспособность у 22,2±0,6 и 20,6±0,6 % спермиев быка соответственно.

В третьем опыте изучено влияние разных концентраций фосфолипидов и пре-

парата БСТ на биологические показатели спермиев быка.

Из таблицы 4 видно, что препарат БСТ в концентрации 0,0025 % в присутствии 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов в составе разбавителя через 5 ч инкубации сохраняет жизнеспособность у 32,4±0,86 и 36,2±0,86 % образцов соответственно.

Таблица 4. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по препарату БСТ, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 13	№ 14	№ 15
Подвижность спермиев (%): до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,8±1,93	68,9±1,93	70,8±1,93	71,2±1,93	70,6±1,93	71,0±1,93
через 60 мин	59,4±1,29	62,5±1,5	61,5±1,5	57,4±1,93	62,8±1,5	62,8±1,5
через 120 мин	47,8±1,29	56,6±1,5	57,0±1,5	48,2±1,29	55,4±1,5	58,0±1,5
через 180 мин	36,3±0,86	48,7±1,1	49,4±1,1	35,8±0,86	48,2±1,1	50,6±1,1
через 240 мин	27,7±0,6	41,4±0,86	40,4±0,86	26,6±0,6	42,3±0,86	41,6±0,86
через 300 мин	21,4±0,6	35,5±0,86	34,4±0,86	20,6±0,6	36,2±0,86	32,4±0,86

С учетом полученных результатов сперму человека инкубировали в разбавителях № 1–3 с фосфолипидом и в разбави-

телях № 7–9 с 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов (таблица 5).

Таблица 5. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГК, на биологические показатели образцов спермы человека

Биологические показатели спермы человека	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 7	№ 8	№ 9
Подвижность спермиев (%): до разведения	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93
после разведения: через 5 мин	68,8±1,5	69,4±1,93	70,0±1,93	70,2±1,93	70,6±1,93	68,8±1,93
через 60 мин	48,8±1,5	60,2±1,5	63,0±1,5	63,5±1,93	68,2±1,5	61,2±1,5
через 120 мин	46,4±1,29	56,4±1,5	54,2±1,5	54,4±1,5	66,0±1,29	65,0±1,5
через 180 мин	38,4±0,86	48,4±1,1	45,4±1,1	48,8±1,1	63,2±1,1	62,2±1,29
через 240 мин	28,2±0,6	42,2±0,86	38,8±0,86	40,4±0,86	58,5±1,1	58,0±1,29
через 300 мин	23,3±0,6	36,2±0,86	32,4±0,86	31,8±0,86	54,0±1,1	52,0±1,1

Из данных таблицы 5 следует, что разбавители, содержащие 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, сохраняли живучесть у $36,2 \pm 0,86$ и $32,4 \pm 0,86$ % спермиев человека соответственно.

Включение в разбавитель № 8 и № 9 АГК в концентрации 0,0025 % и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов способствовало существенному повышению жизнеспособности у $54,0 \pm 1,1$ и $52,0 \pm 1,1$ % спермиев человека соответственно, а относительно исходного показателя – до 73,4–76,2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфолипиды, включенные в состав разбавителя до 10,0 и 20,0 мг, сохраняют через 5 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С выживаемость у $34,4 \pm 0,86$ и $35,5 \pm 0,86$ % спермиев быка и $36,2 \pm 0,86$ и $32,4 \pm 0,86$ % спермиев человека соответственно. Разбавители, содержащие 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, обеспечивают наиболее высокую выживаемость относительно исходного показателя – до 72,9–78,8 % у спермиев быка и 73,4–76,2 % – у спермиев человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Корявкин. – М. : Медицина, 1998. – С. 188–203.
2. Зайцев, В. В. Влияние препаратов торфа на фагоцитоз *in vitro* / В. В. Зайцев, В. М. Козин // Вестник фармации. – Витебск, 1999. – С. 34–36.
3. Козин, В. М. Механизм фармакологического действия препарата биологически активного «Оксидат торфа» / В. М. Козин, В. В. Зайцев // Вестник фармации. – Витебск, 1999. – С. 37–40.
4. Коноплева, А. П. Разбавители спермы и их влияние на эффективность искусственного осеменения / А. П. Коноплева, А. А. Андреева, Т. Н. Трохолис // Тр. ВНИТИП. – Сергиев Посад, 2010. – Т. 85. – С. 25–29.
5. Осташко, Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко. – 2-е изд., доп. и перераб. – Киев : Урожай, 1978. – 255 с.
6. Dörr, T. Editorial: bacterial cell wall structure and dynamics / T. Dörr, P. J. Moynihan, C. Mayer // Front. Microbiol. – 2019. – P. 2051–2052.
7. Vishwanath, R. Storage of bovine semen in liquid and frozen state / R. Vishwanath, P. Shannon // Anim. Reprod. Sci. – 2000. – V. 62. – P. 25–53.
8. Slavetinsky, C. Bacterial aminoacyl phospholipids – biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity / C. Slavetinsky, S. Kuhn, A. Peschel // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. – 2017. – P. 1310–1318.
9. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry / J. Abellón-Ruiz [et al] // Nat. Microbiol. – 2017. – P. 1616–1623.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ВИРОКОКЦИД

ПРИМЕНЯЮТ С ВОДОЙ ИЛИ КОРМОМ

ТЕЛЯТАМ, ЯГНЯТАМ, КОЗЛЯТАМ

► для профилактики и лечения ассоциативных болезней, вызванных эймериями, стронгилятами желудочно-кишечного тракта, трихоцефалами, стронгилоидами

► для стимуляции иммунных процессов при вторичных иммунодефицитах молодняка, вызванных ассоциативными паразитогами

