

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY

Kristina Lukoševičiūtė

**EFFICACY OF FILTRATION METHOD
ON SPERM QUALITY PARAMETRES
AND PROGESTERONE, OESTRADIOL, HEPARIN EFFECT
ON POST-THAW BOVINE SPERMATOZOA**

Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, veterinary medicine (12B)

Kaunas, 2005

The work has been carried out at Lithuanian Veterinary Academy in 2001-2005

Dissertation is written in English.

Research supervisor:

Dr. Aloyzas Januškauskas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Chairman of Veterinary medicine science council:

Ass. Prof. Dr. Eugenijus Aniulis (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Members:

Prof. Habil. Dr. Vytautas Špakauskas (Lithuanian Veterinary Academy, Veterinary Institute, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. at Incumbent. Dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Dr. Rasa Nainienė (Lithuanian Veterinary Academy, Institute of Animal Sciences, biomedical sciences, zootechny - 13B);

Dr. Audrius Kučinskas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

Opponents:

Dr. Arūnas Stankevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Dr. Jonas Kutra (Lithuanian Veterinary Academy, Institute of Animal Sciences, biomedical sciences, zootechny - 13B).

Public defence of doctoral thesis in veterinary medicine science council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 10 am on 20th September of 2005.

Address: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The abstract of doctoral dissertation has been sent on 20th of August, 2005 according to the confirmed address list.

The dissertation is available at the libraries of the Lithuanian Veterinary Academy and LVA Veterinary Institute.

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

Kristina Lukoševičiūtė

**FILTRACIJOS EFEKTYVUMO
IR PROGESTERONO, ESTRADIOLIO, HEPARINO
POVEIKIO BULIŲ SPERMATOZOIDŲ
KOKYBINIAMS RODIKLIAMS, ĮVERTINIMAS**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina (12B)

Kaunas, 2005

Darbas atliktas 2001 – 2005 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje.

Mokslinis vadovas:

dr. Aloyzas Januškauskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Veterinarinės medicinos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba

Pirmininkas:

doc. dr. Eugenijus Aniulis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Nariai:

prof. habil. dr. Vytautas Špakauskas (LVA Veterinarijos institutas, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

e. prof. p. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

dr. Rasa Nainienė (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B);

dr. Audrius Kučinskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

Oponentai:

dr. Arūnas Stankevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

dr. Jonas Kutra (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2005 m. rugsėjo 20 d. 10 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės 18, 47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2005 m. rugpjūčio 20 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Veterinarijos instituto bibliotekose.

IVADAS

Galvijų sėklinimas, kurio tikslas perduoti kitoms palikuonių kartoms genetinę informaciją ir didinti jų skaičių, yra viena iš svarbiausių biotechnologijos žemės ūkyje formų. Sėklinant gyvulius, siekiama genetinę medžiagą panaudoti plačiu arealu bei užtikrinti aukštą apvaisinimo procentą (Graham, 1990). Platinamos genetinės medžiagos kokybė tampa ypatingai svarbi tuo atveju, kada kelių rinktinių bulių sperma yra naudojama sėklinant didelę patelių populiaciją. Šiuo metu karvių sėklinimui plačiausiai yra naudojama kriokonservuota bulių sperma. Kriokonservuota sperma gali būti saugoma ilgą laiką po jos paėmimo, tačiau nors ir taikant pačias pažangiausias spermos šaldymo technologijas, spermatozoidų gyvybingumas po atšildymo siekia tik apie 50%. Kriokonservuojant spermatozoidus, spermatozoidų membranose įvyksta negrįžtami pažeidimai, dėl to spermatozoidai žūsta (Hammerstedt et al., 1990). Taip pat spermatozoidų kriokonservavimas ir po to vykdomas atšildymas sujaukia spermatozoidų membranas, jose atsiranda į spermatozoidų kapacitaciją panašūs pokyčiai ir pakinta atšildytų spermatozoidų apvaisinamoji galia (Cormier et al., 1997).

Veislininkystės įmonės kartais susiduria problema, kai laikui bėgant, dėl metų ar įvairių aplinkos, laikymo, šėrimo ar kitų priežasčių, labai populiarių aukštos genetinės vertės bulių spermos kokybė ima blogėti. Morfologiniai spermatozoidų pakitimai gali atsirasti spermatogenezės ar spermatozoidų brendimo ansėklidyje metu. Buliai nevienodai reaguoja į pasikeitusias aplinkos sąlygas. Kai kurie buliai yra jautresni juos veikiančioms neigiamoms aplinkos sąlygoms, ir jų sėklidėse pradeda formuotis nepilnaverčiai, pakitę spermatozoidai (Barth and Oko, 1989). Negyvi ir morfologiškai pakitę spermatozoidai išskiria medžiagas, kurios neigiamai veikia kitų, šalia esančių, spermatozoidų gyvybingumą (Linderman et al., 1982; Shanon and Curson, 1972) bei įtakoja spermatozoidų apvaisinimo kokybę (Saacke and White, 1972). Ejakuliate esantys spermatozoidai nėra funkciškai identiški, nes yra skirtingo subrendimo lygmens. Iki šiol nėra tiksliai žinoma, kokios savybės apsprendžia spermatozoidų gebėjimą apvaisinti. Bet koks spermatozoidų pažeidimas gali sumažinti spermos galimybę apvaisinti ir jeigu pakankamai didelė spermatozoidų dalis sėklinimo dozėje yra pažeista, tai gali neigiamai įtakoti apvaisinimo kokybę (Amann, 1989). Galvijų veislininkystės ilgalaikis tikslas – sukurti paprastus ir lengvai įgyvendinamus metodus bulių spermos apvaisinimo kokybei pagerinti.

Bulių spermos kokybė gali būti ženkliai pagerinta ją filtruojant (Anzar and Graham, 1995), nes tuomet, pašalinami nejudrūs ir morfologiškai pakitę ir/arba negyvi spermatozoidai. Yra žinoma daug spermos filtracijos metodų, tačiau kiekvienas metodas turi teigiamų ir neigiamų savybių. Kai kurie jų gali sukelti ultrastruktūrinius pakitimus spermatozoido plazmos membranoje ir akrosomoje (Sherman et al., 1981); užteršti filtratą (Daya and Gwatkin, 1987); panaudojus kitus, spermatozoidus reikia papildomai plauti ir centrifuguoti (Lessley and Garner, 1983); treči ženkliai sumažina išfiltruotų spermatozoidų skaičių (Daya et al., 1987). Dauguma spermos filtracijos metodų negali būti taikomi skiedikliu praskiestai spermai (Anzar and Graham, 1993) ir tai sumažina metodo pritaikomumą praktikoje. Spermatozoidų filtracija Sefadex G-15 užpildytose kolonėlėse šiuo metu yra vienas efektyviausių spermos filtracijos metodų, kai atskiriami judrūs spermatozoidai nuo nejudrių; pašalinami pakitę bei negyvi spermatozoidai, padidinamas spermatozoidų su nepažeistomis akrosomomis skaičius (Anzar and Graham, 1993). Be to, šis filtravimo metodas yra paprastas ir nebrangus (Goyal et al., 1996). Kol

kas nėra įvertinta ar Sefadex G-15 spermos filtracijos metodas yra tinkamas naudoti veislininkystės įmonėse gaunamos spermos kokybei pagerinti.

Žinduolių spermatozoidai, patekę į patelės lytinius takus, negali iš karto apvaisinti kiaušialąstės. Pirmiausia jie turi galutinai subręsti, t.y. praeiti parengiamąjį etapą, vadinamą “kapacitacija” (Austin, 1951). Kapacitacija – biocheminis reiškinys, kuris apima pokyčius spermatozoido membranos lipiduose ir baltymuose, jonų kitimą, ciklinio adenozinmonofosfato (cAMP) padidėjimą ir baltymų fosforilizaciją (Fraser, 1990). Kapacitacijos metu kinta spermatozoidų judrumas – spermatozoidai hiperaktyvuoja, jiems prisitvirtinus prie skaidriojo dangalo, išorinė akrosominė membrana susilieja su plazmine spermatozoido membrana ir įvyksta akrosominė reakcija (Yanagimachi and Usui, 1974). Tik kapacitavęs spermatozoidas gali atpažinti ir prisitvirtinti prie specifinių skaidriojo dangalo receptorių, o akrosominė reakcija yra pagrindinė ir svarbiausia sąlyga ištirpinti ir prasiskverbti pro kiaušialąstę supantį skaidrųjį dangalą, patekti į kiaušialąstės vidų ir susiliesti su kiaušialąstės branduoliu. Bet koks sutrikimas gali neigiamai įtakoti šiuos procesus, ir spermatozoidas nesugebės apvaisinti kiaušialąstės. Įvairūs veiksniai reguliuoja šiuos procesus patelės lytiniuose takuose ir vienas iš pagrindinių spermos fiziologinių savybių aktyvatorius yra folikulinis skystis. Folikulinio skysčio sudėtyje yra daug biologiškai aktyvių medžiagų: progesterono, estradiolio ir heparino, kurie išskiriami dideliais kiekiais ovuliacijos metu. Yra pranešimų apie progesterono, estradiolio ir heparino poveikį kai kurių gyvūnų rūšių spermatozoidams. Skatinama spermatozoidų kapacitacija, pasireiškia akrosominė reakcija ir spermatozoidai prisitvirtina prie kiaušialąstės skaidriojo dangalo. Duomenų apie progesterono (P), estradiolio (OE) ir heparino (Hep) (atskirai ar kartu) poveikį atšildytai bulių spermai nėra.

Darbo tikslas:

Įvertinti spermos filtracijos metodo poveikį sėklinimui naudojamoms kriokonservuotoms bulių spermos po atšildymo kokybei bei nustatyti biologiškai aktyvių medžiagų - progesterono, estradiolio, ir heparino - įtaką atšildytos bulių spermos funkcinėms savybėms.

Darbo uždaviniai:

- Įvertinti Sefadex G-15 filtracijos metodo efektyvumą bulių spermatozoidų kokybiniams rodikliams prieš kriokonservavimą ir po spermos atšildymo;
- Įvertinti progesterono poveikį bulių spermatozoidų gyvybingumui, plazminės membranos destabilizacijai, kapacitacijai ir akrosominės reakcijos pasireiškimui po spermos atšildymo;
- Įvertinti estradiolio, heparino atskirai ar kartu, ar drauge su progesteronu poveikį bulių spermatozoidų gyvybingumui, plazminės membranos destabilizacijai, kapacitacijai ir akrosominės reakcijos pasireiškimui po spermos atšildymo;
- Įvertinti progesterono ir estradiolio poveikį spermatozoidų prisitvirtinimui prie kiaušialąstės skaidriojo dangalo;
- Įvertinti progesterono poveikį akrosominės reakcijos pasireiškimui spermatozoidams sąveikaujant su kiaušialąste.

Mokslinio darbo naujumas:

Pirmą kartą įvertintas bulių spermos kokybės gerinimas spermos filtracijos Sefadex G-15 metodu, kuris gali būti taikomas ir veislininkystės įmonėse. Spermos filtracijos metodo efektyvumas buvo įvertintas taikant daug spermatozoidų kokybės vertinimo metodų, palyginant atšildytos spermos kokybės rodiklius prieš ir po filtracijos. Taip pat buvo įvertinta įvairių progesterono koncentracijų; estradiolio, vieno ar su progesteronu, ar kartu su heparinu poveikis įvairiems funkciniais bulių spermatozoidų rodikliams po spermos atšildymo. Pirmą kartą paskelbti tyrimų rezultatai, kuriuose įvertintas kelių biologiškai aktyvių medžiagų bendras poveikis bulių spermatozoidams.

TYRIMŲ METODIKA

Buvo atlikti šie bandymai:

1 *Bandymas*: Įvertintas Sefadex G-15 filtracijos metodo efektyvumas bulių spermatozoidų kokybiniais rodikliais prieš kriokonservavimą ir po spermos atšildymo;

2 *Bandymas*: Įvertintas progesterono poveikis bulių spermatozoidų gyvybingumui, plazminės membranos destabilizacijai, kapacitacijai ir akrosominės reakcijos pasireiškimui po spermos atšildymo;

3 *Bandymas*: Įvertintas estradiolio, heparino atskirai ar kartu, ar su progesteronu poveikis bulių spermatozoidų gyvybingumui, plazminės membranos destabilizacijai, kapacitacijai ir akrosominės reakcijos pasireiškimui po spermos atšildymo;

4 *Bandymas*: Įvertintas progesterono ir estradiolio poveikis spermatozoidų prisitvirtinimui prie kiaušialąstės skaidriojo dangalo;

5 *Bandymas*: Įvertintas progesterono poveikis akrosominės reakcijos pasireiškimui spermatozoidams sąveikaujant su kiaušialąste.

Spermos filtracija (1 bandymas)

Spermos filtracijos bandyme buvo naudojama penkių bulių sperma, su kiekvienu iš jų atliekant penkis pakartojimus. Kiekvieno buliaus du ejakuliatai buvo paimami per 10 min., įvertinus judrumą. Abu ejakuliatai sumaišomi ir praskiedžiami (1:5) TRIS-fruktozės-citrinos rūgšties ir kiaušinio trynio skiedikliu (37°C). Kiekvieno buliaus sperma buvo dalinama į dvi dalis: viena dalis buvo filtruojama per Sefadex G-15 filtrą, o kita dalis buvo naudojama kaip kontrolinė. Spermos filtravimui naudotas 10 ml plastikinis švirkštas, kuris apačioje buvo padengtas plonu sluoksniu stiklo vatos, virš kurios buvo įpilama 3 ml (0,6 g) tame pačiame skiediklyje praskiesto Sefadex G-15. Penki ml spermos buvo filtruojami kambario temperatūroje (20°C) – 1,5 ml/min. greičiu. Vėliau visi spermos mėginiai buvo laikomi 20°C vandens vonelėje 20 min. bei filtruota ir nefiltruota sperma buvo atskiedžiama iki 50×10^6 spermatozoidų/ml ir fasuojama į po 0,25 ml talpos plastikinius šiaudelius. Šiaudeliai buvo 4 h. ekvilibruojami šaldytuve (5°C) bei iššaldomi programuojamoje šaldymo kameroje (Digitcool 5300, IMV Technologies, L'Aigle, France) iki -130°C. Užšaldyti šiaudeliai buvo panardinami į skystą azotą ir laikomi iki jų vertinimo.

Spermos ir biologiškai aktyvių medžiagų paruošimas (2, 3 bandymai)

Atšildytos spermos paruošimas

Bandyme buvo naudojama keturių bulių sperma ir tyrimus pakartojant tris kartus. Sperma buvo gauta iš Lietuvos - Vokietijos įmonės UAB "Litgenas". Kiekvieno buliaus šiaudeliai su sperma buvo atšildomi vandens vonelėje (38°C), įvertinamas spermatozoidų judrumas ir nustatoma koncentracija. Atšildyta sperma buvo praskiedžiama pridedant 2 ml SP-TALP (37°C) terpės ir du kartus centrifuguojama (5 min. 600 x g). Galutinai praskiedus spermatozoidus iki reikiamos koncentracijos bei pridėjus biologiškai aktyvių medžiagų, spermatozoidai buvo inkubuojami 39°C 100% drėgmėje, prisotintoje 5% CO₂.

Spermatozoidų kapacitacija veikiant biologiškai aktyvioms medžiagoms

Spermatozoidai buvo inkubuojami su skirtingomis progesterono koncentracijomis: 0; 0,1; 1 ir 10 µg/ml (2 bandymas) ir su įvairiomis biologiškai aktyviomis medžiagomis a) 1 µg/ml estradioliu; b) 1 µg/ml progesteronu; c) 1 µg/ml estradioliu ir 1 µg/ml progesteronu; d) 1 µg/ml estradioliu ir 5 µg/ml heparinu; e) 1 µg/ml progesteronu ir 5 µg/ml heparinu; f) 1 µg/ml estradioliu, 1 µg/ml progesteronu ir 5 µg/ml heparinu (3 bandymas). Nustatytais laiko tarpais: 0, 60, 120 ir 180 min. po biologiškai aktyvių medžiagų pridėjimo, 45 µl spermos mėginiai buvo paimami ir 15 min. inkubuojami su 100 µg/ml lizofosfatidilcholinu (LPC). LPC kapacitavusiuose spermatozoiduose sužadina akrosominę reakciją, ir neturi neigiamo poveikio spermatozoidų gyvybingumui bei negali sužadinti akrosominės reakcijos nekapacitavusiuose spermatozoiduose (Parrish et al., 1988). Galutinė spermatozoidų koncentracija buvo 5x10⁶ spermatozoidų/ml.

Spermatozoidų akrosominės reakcijos pasireiškimas veikiant juos biologiškai aktyvioms medžiagoms

Spermatozoidai buvo inkubuojami SP-TALP terpėje su 10 µg/ml heparinu (kad įvyktų spermatozoidų kapacitacija) 39°C 100 % drėgmėje, prisotintoje 5% CO₂. Į mėginius iš karto (0 min.) ir po 240 min. jų inkubacijos buvo dedamos skirtingos progesterono 0; 0,1; 1; 10 µg/ml koncentracijos (2 bandymas) ar 1 µg/ml estradiolio; 1 µg/ml progesterono; 1 µg/ml estradiolio kartu su progesteronu koncentracijos (3 bandymas) ir inkubuojama 15 min. Teigiama kontrolė - mėginiai praturtinti 100 µg/ml LPC. Galutinė spermatozoidų koncentracija - 5x10⁶ spermatozoidų/ml.

Spermos tyrimai

Spermos judrumas (1 bandymas)

Spermos judrumas (1 bandymas) buvo nustatomas naudojant kompiuterinį spermos judrumo analizatorių (CASA, SM-CMA, Strömberg-Mika, Bad Feilnbach, Vokietija). Spermos judrumas buvo vertinamas tris kartus: spermą atskiedus (PD), po ekvilibracijos (PE) ir atšildžius kriokonservuotus mėginius (PT). Buvo vertinama ne

mažiau 200 spermatozoidų, ne mažiau kaip 8 matymo laukuose ir nustatomi įvairūs spermatozoidų judrumo rodikliai.

Spermatozoidų morfologijos įvertinimas (1 bandymas)

Spermatozoidų galvučių pakitimai buvo nustatomi juos dažant eozino-anilino dažais (Shaffer and Almquist, 1948). Buvo vertinama 500 spermatozoidų (Soderquist et al., 1991) šviesos mikroskopu (x1000 padidiniu). Spermatozoidų pakitimai uodegėlėse buvo nustatomi juos fiksuojant formalinu ir vertinant 200 spermatozoidų. Tiriama - fazių kontrasto optika (x1000 padidiniu).

Vertinimas tėkmės citometru

Tyrimai buvo atlikti naudojant LSR tėkmės citometrą (Bandymas 1) (Becton Dickinson, San Jose, CA, JAV) ir FacsCalibur tėkmės citometras (Becton Dickinson, San Jose, CA, JAV) (2 ir 3 bandymai). Spermatozoidų chromatino stabilumas buvo vertinamas BD FACSSStar Plus tėkmės citometru (Becton Dickinson, San Jose, CA, JAV) (1 bandymas).

Kiekviename mėginyje buvo vertinama 10 000 spermatozoidų.

Spermatozoidų gyvybingumo nustatymas su SYBR-14/PI (1 bandymas)

Spermatozoidų gyvybingumui nustatyti buvo naudojama GYVŲ/NEGYVŲ spermatozoidų gyvybingumo dažai (Molecular Probes Inc., L7011 Eugene, OR, JAV). Atšildyta 5×10^6 spermatozoidų/ml koncentracijos sperma 10 min. buvo inkubuojama su 100 nM SYBR-14 ir 12 μ M PI koncentracijų fluorescenciniais dažais 38°C temperatūroje, o vertinimas atliekamas tėkmės citometru. Dažant spermatozoidus fluorescenciniais dažais SYBR-14 ir PI, populiacijos fluorescavo žalia ir raudona spalvomis.

Spermatozoidų mitochondrijų membranų potencialo įvertinimas su Mitotracker Deep Red/SYBR-14 (1 bandymas)

Du fluorescenciniai dažai Mitotracker Deep Red/SYBR-14 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, JAV) buvo naudojami vertinant spermatozoidų mitochondrijų membranų potencialo skirtumą po atšildymo. Galutinės koncentracijos buvo 5 nM SYBR-14 ir 100 nM Mitotracker Deep Red. Jie buvo inkubuojami 10 min. 38°C temperatūroje tamsoje su atšildytais spermatozoidais (1×10^6 spermatozoidų/ml) ir vertinami tėkmės citometru. Pagal nusidažymo intensyvumą, spermatozoidai buvo diferencijuojami į spermatozoidus, su žemo potencialo mitochondrine membrana (fluorescavo intensyviai raudona spalva), ir spermatozoidus, su aukšto potencialo mitochondrine membrana (fluorescavo blankiai raudona spalva).

Spermatozoidų akrosominės membranos būklės įvertinimas su SYBR-14/PE-PNA/PI dažais (1 bandymas)

Spermatozoidų dažymas buvo atliktas pagal Nagy ir kt. (2003) sukurta metodiką. Atšildyta 5×10^6 spermatozoidų/ml koncentracijos sperma buvo dažoma su 100 nM SYBR-14, 2,5 µg/ml PE-PNA tirpalu (1 mg/ml darbinio tirpalo su 3,0 M amonio sulfatu, 50 mM natrio fosfatu ir 0.05% natrio azidu, pH 7.0, sudarytas iš 1 mM $[Ca_2^+]$ ir $[Mn_2^+]$ jonų) ir 12 µM PI bei inkubuojama 10 min. 38°C temperatūroje prieš mėginių vertinimą. SYBR-14 fluorescenciniai dažai nudažo ląsteles, turinčias DNR; PI dažo ląsteles su sutrūkusia plazmine membrana; PE-PNA – ląsteles su pažeista akrosomine membrana.

Pagal SYBR-14/PI nusidažymą, spermatozoidai buvo klasifikuojami į gyvus, negyvus ir mirštančius spermatozoidus. Pagal PE-PNA/PI nusidažymą, spermatozoidai buvo klasifikuojami į gyvus spermatozoidus, su nepažeista akrosoma; gyvus, su pažeista akrosoma; negyvus, su nepažeista akrosoma, ir negyvus, su pažeista akrosoma.

Spermatozoidų plazminės membranos būklės įvertinimas su Merocyanine 540/Yo-PRO-1/ Hoechst 333542 dažais (1-3 bandymai)

Atšildyta sperma (1 bandymas) ar spermos mėginiai (2 ir 3 bandymas), inkubuoti su biologiškai aktyviomis medžiagomis 0, 60, 120 ir 180 min., buvo praskiedžiami iki 1×10^6 spermatozoidų/ml koncentracijos su fluorescenciniais dažais: 25 µM Yo-PRO 1 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, JAV; Y 3603) ir 1 Mm Merocyanine-540 (M-540, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, JAV; M 24571) (1-3 bandymai), 5 mg/ml Hoechst 333542 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, JAV) (1 bandymas) ir inkubuojami tamsoje 10 min. 38°C temperatūroje prieš vertinimą tėkmės citometru.

Merocianinas reaguoja su kiaušinio tryniu, esančiu spermos skiediklyje, todėl Hoechst 333542 fluorescenciniai dažai buvo naudojami diskriminuoti spermatozoidus nuo pašalinių dalelių, t.y. dalelių, kurios neturi DNR. Bandymuose 2 ir 3 fluorescenciniai dažai Hoechst 333542 nebuvo naudojami, nes spermatozoidai buvo plaunami prieš juos nudažant merocianinu.

Pagal nusidažymą, spermatozoidai buvo klasifikuojami į gyvus, su stabilia, nepažeista plazmine membrana (Yo-PRO1 neigiami, M-540 neigiami); gyvus, su pažeista, destabilizuota plazmine membrana (Yo-PRO 1 neigiami, M-540 teigiami) ir negyvus (Yo-PRO 1 teigiami).

Spermatozoidų chromatinio stabilumo įvertinimas su akridino oranžinio dažais (1 bandymas)

Spermatozoidų dažymas buvo atliktas pagal Evenson ir kt. (1980) sukurta metodiką. Atšildyti spermatozoidų mėginiai (0,2 ml) buvo atskiesti TNE buferiniu tirpalu (0,15 M NaCl, 0,01M TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) iki 2×10^6 spermatozoidų/ml koncentracijos, iš karto užšaldyti azoto garuose ir laikomi (-80°C) šaldiklyje iki jų vertinimo tėkmės citometru. Spermatozoidų DNR buvo dalinai denatūruota, į mėginius su spermatozoidais įpylus 0,4 ml žemo pH detergentinį tirpalą (0,17% Triton X-100; 0,15 M NaCl ir 0.08 N HCl, pH 1,4) ir mėginiai iš karto nudažyti akridino oranžinio fluorescenciniais dažais (6 µg/ml ištirpinti 0,1M citrinos rūgšties buferiniame tirpale, pH 6,0). Mėginiai buvo vertinami po 3 min. tėkmės citometru.

Nusidažę akridino oranžiniu spermatozoidai ir pakitusi chromatino struktūra buvo nustatoma pagal padidėjusį spermatozoidų imlumą rūgšties sukeltai DNR denatūracijai, o vertinamas atliekamas tėkmės citometru ir išreiškiamas metachromatininiu akridino oranžinio fluorescencijos poslinkiu iš nuo žalios (dvigubaDNR) fluorescencijos link raudonos (denatūruota, viengubaDNR) ir išreiškiamas funkcija α_t , kurie parodo raudonos fluorescencijos santykį su bendra (žalia ir raudona) fluorescencija. Alfa ti (α_t) buvo apskaičiuojama kiekvieno spermatozoido, esančio mėginyje, ir buvo išreiškiama kaip vidurkis ($\bar{x}$ α_t), standartinis nuokrypis α_t (SD α_t) ir procentas ląstelių su didelėmis α_t reikšmėmis, vadinamomis ląstelėmis, esančioms už pagrindinės ląstelių populiacijos ribos (%COMP_{at}), parodančias ląsteles su dideliu kiekiu viengubos DNR.

Spermatozoidų akrosominės reakcijos įvertinimas (2 ir 3 bandymai)

Spermatozoidų akrosomos vientisumui įvertinti ir diferencijuoti juos į gyvus ir negyvus, buvo naudojami du fluorescenciniai dažai: EthD-1 (23,33 μ M, Sigma-Aldrich) ir PNA-FITC (100 μ g/ml, Sigma-Aldrich). Dažymas buvo atliktas pagal Cheng ir kt. (1996) dažymo protokolą. Nudažius spermatozoidus, mėginiai buvo laikomi tamsioje 4°C temperatūroje. Prieš vertinimą buvo daromi tepinėliai ir vertinami fluorescenciniu mikroskopu (CETI, Kontich, Belgija) 200 spermatozoidų skirtinguose matymo laukuose. Spermatozoidai buvo klasifikuojami pagal jų nusidažymą. Pagal tai, spermatozoidai su nudažytu EthD-1 branduoliu buvo klasifikuojami kaip negyvi spermatozoidai. Su nenusidažiusiais branduoliais buvo priskiriami gyvų spermatozoidų kategorijai. Spermatozoidai su nepažeista akrosoma (AI) buvo spermatozoidai, kurių visa akrosoma nusidažiusi PNA-FITC fluorescenciniais dažais; spermatozoidai su netolygia PNA-FITC fluorescencija turėjo pažeistas akrosomas bei buvo su prasidėjusia akrosomine reakcija (AD); spermatozoidai, kurių nusidažę ekvatoriniai segmentai su PNA-FITC, buvo priskiriami kaip spermatozoidai, su įvykusia akrosomine reakcija (AR).

Spermatozoidų prisitvirtinimas prie skaidriojo dangalo

Kiaušialąsčių paruošimas in vitro bandymams (4-5 bandymai)

Skerdžiamų karvių ir telyčių kiaušidės buvo imamos iš skerdyklos (UAB “Samsonas”, Šakiai), talpinamos į termosą su 0,9% NaCl (35°C) ir 50 μ g/ml gentamicinu, ir per 4 h atvežamos į LVA Gyvulių reprodukcijos laboratoriją. Kiaušialąstės buvo aspiruojamos iš 2-6 mm dydžio folikulų, tris kartus perplaunamos PBS tirpalu su 5% karštyje inaktyvuotu (56°C, 30 min.) rujojančių karvių serumu ir laikomos per naktį 4°C (apie 15 h). Prieš kiaušialąsčių ir spermatozoidų inkubaciją, kiaušialąstės buvo perplaunamos 3 kartus Fert-TALP terpėje ir 3 h inkubuojamos 39°C 100% drėgmėje, prisotintoje 5% CO₂.

Spermatozoidų, prisitvirtinimo prie skaidriojo dangalo, vertinimas (4 bandymas)

Penkios kiaušialąstės buvo talpinamos į ekvilibruotą 50 μ l Fert-TALP terpės lašelį be (kontrolė) ar su biologiškai aktyviomis medžiagomis, kurių galutinės koncentracijos a) 0,1 μ g/ml progesterono; b) 0,5 μ g/ml progesterono; c) 0,5 μ g/ml progesterono ir 0,1 μ g/ml estradiolio. Penkiasdešimt mikrolitrų 2×10^6 spermatozoidų/ml koncentracijos

sperma, po išplaukimo (swim-up) ir 3 h kapacitacijos, buvo dedama į lašelį su kiaušialąstėmis ir inkubuojami 1 h 39°C 100% drėgmės aplinkoje, prisotintoje 5% CO₂. Po inkubacijos spermatozoidų-kiaušialąsčių junginiai buvo 6 kartus perplaunami su Fert-TALP terpe ir dažomi 0,2 μM Syto-16 green (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Olandija) fluorescenciniais dažais. Prisitvirtinusių spermatozoidų skaičius buvo nustatomas fluorescenciniu mikroskopu (CETI, Kontich, Belgija) ×250 padidiniu.

Šiame bandyme ištirta 120 kiaušialąsčių. Su kiekviena grupe po 10 kiaušialąsčių buvo atliekami 3 pakartojimai, juos inkubuojant su keturių skirtingų bulių spermatozoidais.

Akrosominės reakcijos pasireiškimo, spermatozoidams sąveikaujant su kiaušialąste, įvertinimas (5 bandymas)

Penkiasdešimt mikrolitrų 3×10⁶ spermatozoidų/ml koncentracijos sperma po spermatozoidų išplaukimo (swim-up) ir 3 h kapacitacijos, buvo dedama į 50 μl Fert-TALP lašelį su 5 kiaušialąstėmis ir 0,1% DMSO (kontrolė) ar Fert-TALP terpe su 1 μg/ml progesteronu ir inkubuojama 1 h 39°C drėgnoje aplinkoje, prisotintoje 5% CO₂. Po inkubacijos spermatozoidų-kiaušialąsčių kompleksai buvo 5 kartus perplaunami ir toliau inkubuojami terpėje su DMSO ar progesteronu. Nustatytais inkubacijos periodais - 0, 60, 120 ar 180 min. buvo vertinama spermatozoidų, prisitvirtinusių prie kiaušialąstės, akrosomos būklė. Kompleksai buvo dažomi 5 μl 23,33 μg/ml EthD-1 PBS tirpale ir 5 μl 100 μg/ml PNA-FITC PBS tirpale. Spermatozoidai buvo vertinami fluorescenciniu mikroskopu (CETI, Kontich, Belgija) ir klasifikuojami į 2 kategorijas: spermatozoidai, kurių netolygi PNA-FITC fluorescencija, turėjo pažeistas akrosomas bei buvo su prasidėjusia akrosomine reakcija (AD); spermatozoidai, kurių nusidažę ekvatoriniai segmentai su PNA-FITC, buvo priskiriami kaip spermatozoidai, su įvykusia akrosomine reakcija (AR).

Šiame bandyme ištirta 240 kiaušialąsčių. Su kiekviena grupe po 5 kiaušialąstes buvo atliekami 3 pakartojimai skirtingais inkubacijos periodais juos inkubuojant su keturių skirtingų bulių spermatozoidais.

Duomenų statistinė analizė:

Statistinė analizė buvo atlikta SPSS statistiniu paketu (SPSS Inc, 1989-1995).

REZULTATAI

Sefadex G-15 filtracijos metodo efektyvumas bulių spermatozoidų kokybiniams rodikliams prieš kriokonservavimą ir po spermos atšildymo

Šviežios bulių spermos koncentracija vidutiniškai buvo $1,85 \pm 0,2 \times 10^9$ spermatozoidų/ml. Spermą praskiedus, jos koncentracija sumažėjo iki $369,5 \pm 0,2 \times 10^6$ spermatozoidų/ml. Po spermos filtracijos jos koncentracija sumažėjo 1/3 karto ir buvo vidutiniškai $227,2 \pm 0,1 \times 10^6$ spermatozoidų/ml ($p < 0,01$).

Šviežios spermos judrumas buvo $83,3 \pm 7,6\%$. Filtracija neturėjo jokio statistiškai patikimo poveikio ($p > 0,05$) spermatozoidų judrumui atskiestoje spermoje (PD).

Ekvilibruotoje spermoje (PE) spermos filtracija statistiškai patikimai pagerino bendrą spermatozoidų judrumą (MOT). Kiti su judrumu susiję rodikliai buvo didesni filtruotoje spermoje, tačiau rezultatai statistiškai nepatikimi ($p > 0,05$). Mėginiuose po spermos atšildymo (PT) filtruotoje spermoje buvo statistiškai patikimai didesnis skaičius judrių spermatozoidų (MOT) nei nefiltruotoje spermoje (1 lentelė).

1 lentelė. Filtracijos poveikis į spermatozoidų judrumą, vertinant skirtingais kriokonservavimo etapais: po spermos atskiedimo (PD); po ekvibracijos, prieš užšaldymą (PE); po kriokonservavimo ir atšildymo (PT).

Table 1. Effect of filtration on sperm motility patterns during different stages of cryopreservation: after final dilution (PD), after equilibration, prior freezing (PE), and after freezing and thawing (PT).

Rodikliai	PD		PE		PT	
	Nefiltruota sperma	Filtruota sperma	Nefiltruota sperma	Filtruota sperma	Nefiltruota sperma	Filtruota sperma
MOT ^a	83,4 ± 1,6	85,0 ± 1,6	74,7 ± 3,4	83,2 ± 2,0*	50,0 ± 3,6	60,0 ± 3,2*
LIN (CASA) ^b	45,1 ± 2,9	41,3 ± 2,8	49,1 ± 2,9	48,9 ± 2,0	53,5 ± 2,5	53,4 ± 2,4
CIRC ^c	3,1 ± 0,4	2,3 ± 0,4	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,4
Not-LIN ^f	18,4 ± 1,3	19,2 ± 1,4	16,5 ± 1,6	16,8 ± 1,1	15,1 ± 1,1	15,7 ± 1,2

Reikšmės parodo $X \pm S.E.M.$ - vidurkių ir jų standartines paklaidas penkių bulių, su kiekvienu atliekant penkis pakartojimus.

Reikšmės statistiškai patikimai skiriasi, lyginant nefiltruotos ir filtruotos spermos rodiklius skirtingais veikimo etapais * = $p < 0,05$.

^a Judrūs spermatozoidai (%), įvertinti CASA.

^b Linijškai judantys spermatozoidai (%), įvertinti CASA.

^c Maniežiniu judėjimu judantys spermatozoidai (%), įvertinti CASA.

^f Nelinijškai judantys spermatozoidai (%), įvertinti CASA.

Spermatozoidų morfologinis vertinimas buvo atliekamas prieš spermos ekvibraciją. Filtruotoje spermoje ženkliai sumažėjo įvairių morfologiškai pakitusių spermatozoidų formų. Spermatozoidų su uodegėlių morfologiniais pakitimais ir spermatozoidų be uodegėlių filtruotoje spermoje nesumažėjo (2 lentelė).

Spermatozoidų su vientisa plazmine membrana (gyvų) buvo statistiškai patikimai daugiau 41,2 ± 3,7% filtruotoje spermoje nei nefiltruotoje 34,8 ± 3,8%.

Filtracija neturėjo poveikio spermatozoidų mitochondrijų membranų potencialui. Filtruotoje spermoje spermatozoidų su žemu mitochondrijų potencialu buvo 38,9 ± 2,4% ir nefiltruotos spermos mėginiuose – 34,9 ± 2,3%. Rezultatai statistiškai patikimai nesiskyrė ($p > 0,05$).

Filtruotoje spermoje buvo daugiau gyvybingų spermatozoidų su vientisa, nepažeista akrosoma - 37,7 ± 3,7% nei nefiltruotoje spermoje – 32,2 ± 3,8% ($p < 0,01$). Spermatozoidų, su pažeista akrosomine membrana filtruotoje ir nefiltruotoje spermoje buvo panašus skaičius, atitinkamai – 2,3 ± 0,2% ir 1,9 ± 0,2%.

2 lentelė. Filtracijos poveikis spermatozoidų morfologiniams rodikliams prieš spermos ekvibraciją.

Table 2 Effect of filtration on sperm morphological characteristics assessed after final dilution (PD).

Rodikliai	Nefiltruota sperma	Filtruota sperma
Patologinės spermatozoidų galvutės	12,3 ± 1,9	8,4 ± 1,5***
Nepakitusios spermatozoidų galvutės	87,6 ± 1,9	91,6 ± 1,5***
Kriaušės formos galvutės	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,2
Siauro pagrindo galvutės	1,7 ± 0,5	1,3 ± 0,4
pakitusios formos galvutės	1,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2**
Neišsivystę spermatozoidai	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1*
Pakitusios formos be uodegėlių galvutės	3,8 ± 1,2	3,4 ± 1,1
Kiti	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2***
Akrosomų pakitimai	0,1 ± 0,0	0,02 ± 0,0*
Vidurinės dalies pažeidimai	3,5 ± 0,6	2,1 ± 0,3**
Proksimaliniai lašeliai	4,7 ± 1,0	4,0 ± 0,8
Distaliniai lašeliai	5,0 ± 1,0	4,4 ± 1,1
Galvutės be uodegėlių	3,2 ± 0,9	4,5 ± 1,4
Patologinės uodegėlės	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,5
Paprastai susisukusios uodegėlės	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,4
Uodegėlės susisukusios po galvutę	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Dvigubai susisukusios uodegėlės	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2

Reikšmės parodo $X \pm S.E.M.$ - vidurkius ir jų standartines paklaidas penkių bulių, su kiekvienu atliekant penkis pakartojimus.

Reikšmės statistiškai patikimai skiriasi lyginant nefiltruotos ir filtruotos spermos rodiklius * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Vertinant spermatozoidų plazminės membranos stabilumą, nustatyta, kad filtruotoje ir nefiltruotoje spermoje gyvų spermatozoidų su nestabilia plazmine membrana duomenys buvo panašūs - $0,2 \pm 0,1\%$ ir $0,3 \pm 0,1\%$. Gyvų spermatozoidų filtruotos spermos mėginiuose buvo daugiau - $38,1 \pm 2,6\%$ nei nefiltruotoje spermoje - $32,7 \pm 2,6\%$.

Vertinant spermatozoidų chromatino stabilumą, nustatyta, kad tirtuose mėginiuose tik nedidelė dalis spermatozoidų turėjo pažeistą DNR. Filtruotoje spermoje, spermatozoidų su pažeista DNR, buvo $3,1 \pm 0,5\%$ (COMP (α_i)), o nefiltruotoje - $3,0 \pm 0,4\%$ (COMP (α_i)).

Biologiškai aktyvių medžiagų poveikis atšildytiems bulių spermatozoidams (2-3 bandymai)

Spermatozoidų gyvybingumas ir plazminės membranos destabilizacija

Šio bandymo metu buvo nustatytas progesterono poveikis spermatozoidų gyvybingumui ir plazminės membranos destabilizacijai (2 bandymas). Inkubacijos

pradžioje tirtuose mėginiuose buvo $58,0 \pm 11,0\%$ gyvų spermatozoidų. Po 180 min. inkubacijos spermatozoidų gyvybingumas sumažėjo iki $43,8 \pm 6,5\%$. Mėginiuose, inkubuotuose su progesteronu, gyvų spermatozoidų skaičius buvo didesnis nei kontroliniuose mėginiuose, tačiau progesterono poveikis spermatozoidų gyvybingumui nebuvo statistiškai patikimas ($p > 0,05$) (3 lentelė). Skirtingų progesterono koncentracijų poveikis atšildytų bulių spermatozoidų gyvybingumui buvo panašus ir statistiškai patikimai nesiskyrė ($p > 0,05$).

3 lentelė. Progesterono poveikis kriokonservuotų atšildytų bulių spermatozoidų gyvybingumui skirtingais inkubacijos periodais.

Table 3. Effect of progesterone on frozen-thawed bull sperm viability during prolonged incubation in capacitating medium.

Medžiagos	Gyvybingumas (%)			
	0 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Kontrolė	$58,0 \pm 11,4$	$51,2 \pm 8,7$	$46,0 \pm 12,3$	$43,0 \pm 8,6$
P (0,1 µg/ml)		$55,3 \pm 12,1$	$49,7 \pm 8,4$	$43,3 \pm 4,7$
P (1 µg/ml)		$55,2 \pm 11,1$	$49,8 \pm 10,6$	$44,5 \pm 5,6$
P (10 µg/ml)		$52,0 \pm 13,1$	$48,5 \pm 9,4$	$44,6 \pm 7,0$

Reikšmės parodo $X \pm SD$ - vidurkius ir jų standartinius nuokrypius keturių bulių, su kiekvienu atliekant tris pakartojimus. Rezultatai statistiškai patikimai nesiskyrė nuo kontrolės ($p > 0,05$).

Vertinant spermatozoidų plazminės membranos destabilizaciją, nustatyta, kad jau po 60 min. spermatozoidų inkubacijos, spermatozoidų su pažeista plazmine membrana skaičius padidėjo 3,1 karto (1 paveikslas). Šis skaičius nekito likusias dvi inkubacijos valandas.

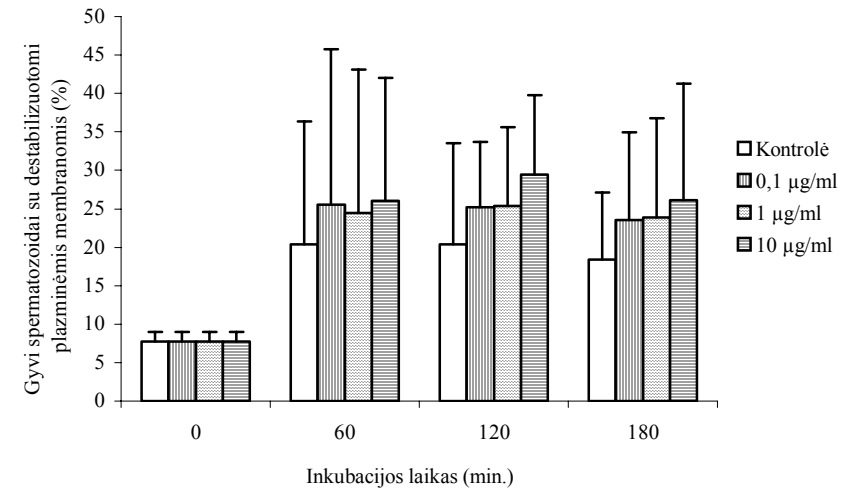
Mėginiuose, inkubuotuose su progesteronu, spermatozoidų su destabilizuota plazmine membrana skaičius buvo didesnis nei kontrolėje. Didžiausią poveikį spermatozoidų plazminės membranos destabilizacijai turėjo 10 µg/ml progesteronas. Jis turėjo skirtingą poveikį atskirų bulių spermatozoidams.

Kitame, bandyme (3) atšildyti bulių spermatozoidai buvo inkubuojami su estradioliu, progesteronu arba kartu, arba su heparinu. Inkubacijos pradžioje mėginiuose buvo nustatyta $63,4 \pm 6,5\%$ gyvų spermatozoidų, o po 180 min. inkubacijos gyvų spermatozoidų skaičius sumažėjo iki $40,7 \pm 6,0\%$. Mėginiuose, inkubuotuose su estradioliu, progesteronu ar estradioliu-progesteronu kartu, buvo didesnis procentas gyvų spermatozoidų nei kontrolėje, tačiau jų poveikis spermatozoidų gyvybingumui buvo statistiškai nepatikimas ($p < 0,05$) (4 lentelė).

Panašiai kaip ir 2 bandyme nustatyta, kad spermatozoidų plazminės membranos destabilizacija priklausė nuo inkubacijos laiko. Spermatozoidų skaičius su destabilizuota plazmine membrana padidėjo po 60 min. jų inkubacijos (2 paveikslas).

Estradiolis pasižymėjo spermatozoidų membranas stabilizuojančiomis savybėmis lyginant su kontrole ir kartu su progesteronu, estradiolis sumažino jo poveikį spermatozoidų plazminės membranos destabilizacijai. Veikiant heparinui, spermatozoidų skaičius su destabilizuota plazmine membrana padidėjo tris kartus lyginant su kontrole, skirtumas statistiškai patikimas ($p < 0,001$). Heparinas panaikino estradiolio plazminės

membranos stabilizuojantį poveikį ir spermatozoidų skaičius su destabilizuotomis plazminėmis membranomis išliko toks pat visą likusį inkubacijos periodą (2 paveikslas).



1 paveikslas. Progesterono poveikis kriokonservuotų ir atšildytų bulių ($n = 4$ buliai) spermatozoidų plazminės membranos destabilizacijai skirtingais jų inkubacijos periodais. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinę nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai nesiskyrė nuo kontrolės ($p > 0.05$).

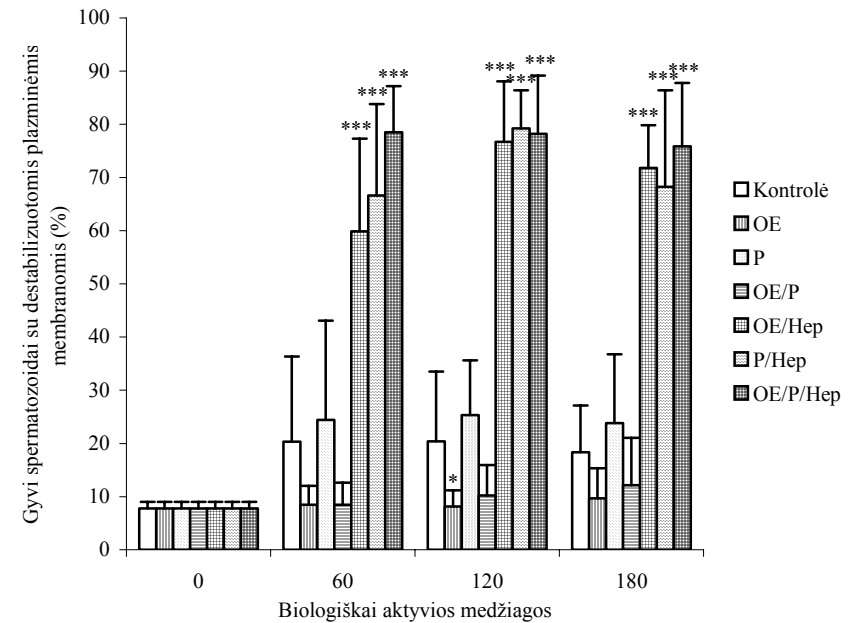
Figure 1. Time course of progesterone (P) induction of plasma membrane lipid destabilization (scrambling), expressed as changes of high merocyanine stainability in frozen-thawed bull sperm populations ($n = 4$ bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates. There were no significant differences compared with the control ($p > 0.05$).

4 lentelė. Biologiškai aktyvių medžiagų poveikis kriokonservuotų atšildytų bulių spermatozoidų gyvybingumui skirtingais inkubacijos periodais.

Table 10. Viability of spermatozoa following prolonged incubation with OE, Hep, P alone or in combination.

Medžiagos	Gyvybingumas (%)				
	0 m	0 min.	60 min.	120 min.	180 min.
Kontrolė	63,4 ± 6,9		53,1 ± 6,7	42,9 ± 6,7	39,6 ± 5,7
OE			53,5 ± 7,7	45,5 ± 11,4	41,3 ± 9,1
P			57,1 ± 9,1	46,7 ± 5,0	41,1 ± 2,7
OE/P			53,7 ± 5,4	47,4 ± 7,5	43,6 ± 8,5
OE/Hep			54,4 ± 6,3	39,6 ± 9,0	41,6 ± 5,7
P/Hep			51,4 ± 6,5	45,2 ± 5,7	38,8 ± 5,8
OE/P/Hep			54,2 ± 7,0	40,8 ± 5,5	39,0 ± 4,4

Reikšmės parodo $X \pm SD$ - vidurkius ir jų standartinius nuokrypius keturių bulių, su kiekvienu atliekant tris pakartojimus. Rezultatai statistiškai patikimai nesiskyrė nuo kontrolės ($p > 0,05$).



2 paveikslas. Laiko ir estradiolio, heparino, progesterono vieno ar visų drauge paimtų faktorių poveikis kriokonservuotų bulių ($n = 4$ buliai) spermatozoidų plazminės membranos destabilizacijai po atšildymo. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinį nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės $* = p < 0,05$; $*** = p < 0,001$.

Figure 2. Effect of time and OE, Hep, P alone or in combination on plasma membrane scrambling, expressed as changes of high merocyanine stainability of frozen-thawed bull sperm populations ($n = 4$ bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates. Mean values in the column differ significantly from the control where $* = p < 0.05$; $*** = p < 0.001$.

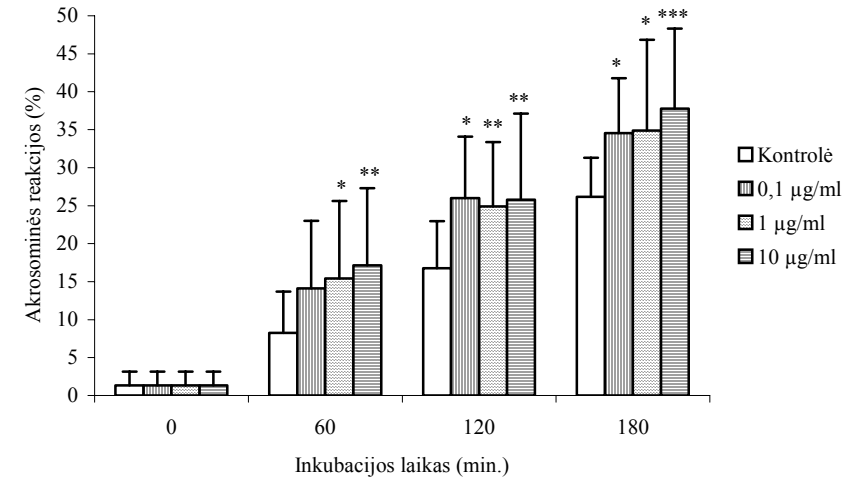
Biologiškai aktyvios medžiagos skirtingai veikė į skirtingų bulių spermatozoidus.

Spermatozoidų kapacitacija

Eksperimentinis modelis – inkubacijos laikas, skirtingos progesterono koncentracijos ir buliai turėjo statistiškai patikimą poveikį ($p < 0,001$) spermatozoidų kapacitacijos pasireiškimui, kuris buvo nustatytas vertinant lizofosfatidilcholino (LPC)

sukeltų akrosominių reakcijų pasireiškimą (2 bandymas). LPC buvo naudojamas kaip netiesioginis metodas kapacitavusių spermatozoidų įvertinimui.

Didelį poveikį spermatozoidų kapacitacijai turėjo laikas ($p < 0,001$). Didėjant inkubacijos laikui, visuose mėginiuose didėjo kapacitavusių spermatozoidų skaičius (išreikštų kaip gyvi spermatozoidai, su įvykusia akrosomine reakcija) (3 paveikslas).



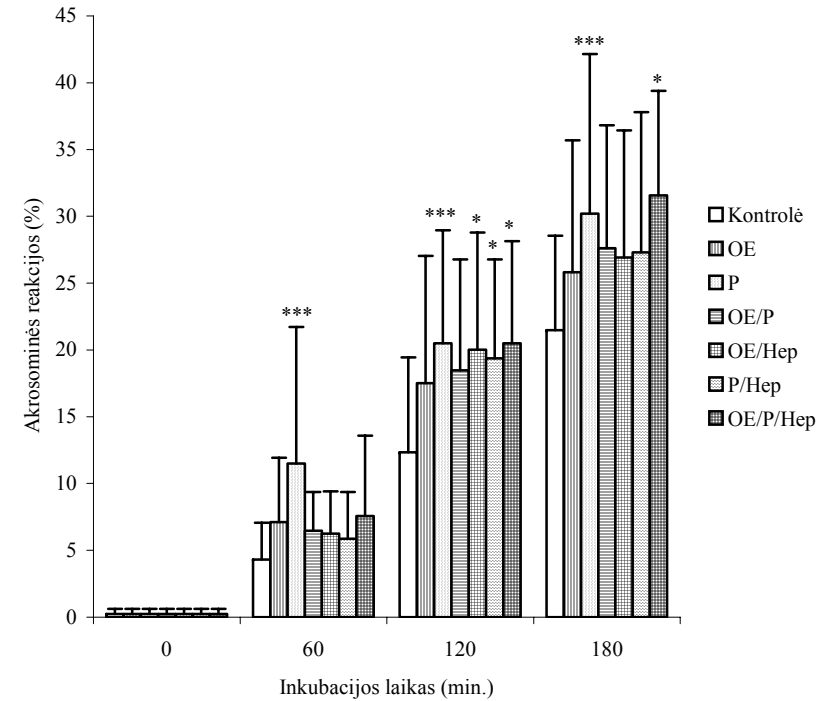
3 paveikslas. Laiko ir įvairių progesterono koncentracijų poveikis į kapacitacijos pasireiškimą (išreikšta LPC sukeltų akrosominių reakcijų pasireiškimu, $n = 4$ buliai) spermatozoiduose. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinį nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figure 3. Effect of time and increasing concentrations of progesterone on the incidences of capacitated spermatozoa (expressed as live acrosome-reacted spermatozoa following LPC treatment). Mean values in the column differ significantly from the control, where * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ ($n = 4$ bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates

Mėginiuose, inkubuotuose su skirtingomis progesterono koncentracijomis, kapacitavusių spermatozoidų skaičius buvo didesnis lyginant su kontrole. Skirtingų koncentracijų progesteronas turėjo panašų poveikį į spermatozoidų kapacitacijos pasireiškimą, tačiau didžiausias skaičius kapacitavusių spermatozoidų buvo mėginiuose, inkubuotuose su 10 µg/ml progesteronu. Mėginiuose, inkubuotuose su 10 µg/ml progesteronu, buvo nustatyta 11,6% kapacitavusių spermatozoidų daugiau nei kontroliniuose po 180 min. spermatozoidų inkubacijos (3 paveikslas). Atskirų bulių spermatozoidai skirtingai reagavo į progesterono poveikį.

Ekperimentinis modelis, apimantis įvairius faktorius, t.y. – inkubacijos laikas, biologiškai aktyvios medžiagos (estradiolis, progesteronas vieni ar kartu, ar su heparinu) ir buliai turėjo reikšmingą poveikį ($p < 0,001$) spermatozoidų kapacitacijos pasireiškimui,

kuris nustatytas vertinant LPC-sukeltų akrosominių reakcijų pasireiškimą (3 bandymas). Inkubacijos laikas turėjo statistiškai patikimą poveikį ($p < 0,001$) kapacitavusių spermatozoidų pasireiškimui. Ilgėjant inkubacijos laikui, didėjo kapacitavusių spermatozoidų skaičius nustatant pagal LPC sužadintų akrosominių reakcijų (AR) pasireiškimą gyvuose spermatozoiduose (4 paveikslas).



4 paveikslas. Laiko ir biologiškai aktyvių medžiagų poveikis į kapacitacijos pasireiškimą (išreikšta LPC sukeltų akrosominių reakcijų pasireiškimu, $n = 4$ buliai) spermatozoiduose. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinį nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

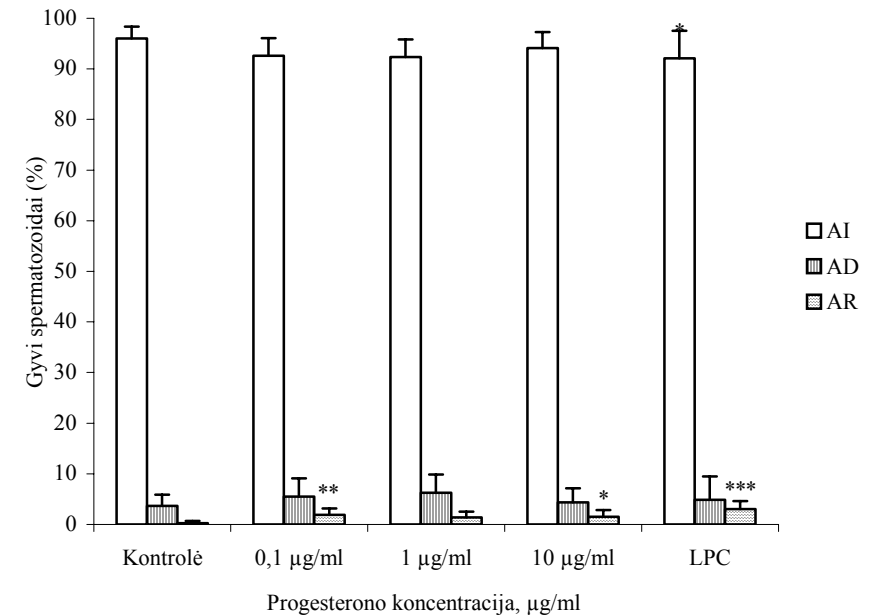
Figure 4. Effect of time and biologically active substances on the incidences of capacitated spermatozoa (expressed as live acrosome-reacted spermatozoa following LPC treatment, $n = 4$ bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates. Means values in the column differ significantly from the control, where * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$.

Po 60 min. spermatozoidų inkubacijos, kapacitavusių spermatozoidų skaičius ženkliai padidėjo, tačiau tik progesteronas, iš visų naudotų biologiškai aktyvių medžiagų, turėjo statistiškai patikimą ir didžiausią poveikį spermatozoidų kapacitacijai (4

paveikslas). Heparinas, kartu su estradioliu ir progesteronu, priešingai nei veikiant į spermatozoidų plazminės membranos destabilizaciją, nesustiprino jų poveikio. Buliai veikiant biologiškai aktyvioms medžiagoms į spermatozoidų kapacitacijos pasireiškimą, statistiškai patikimai skyrėsi ($p < 0,001$).

Spermatozoidų akrosominės reakcijos pasireiškimas

Antro bandymo metu buvo tiriamas progesterono poveikis į atšildytos bulių spermos akrosominės reakcijos pasireiškimą. Inkubacijos pradžioje buvo tik keli procentai spermatozoidų, su pažeistomis akrosomomis (AD) ir su įvykusia akrosomine reakcija (AR). Dauguma spermatozoidų turėjo nepažeistas akrosomas (AI) (5 paveikslas).

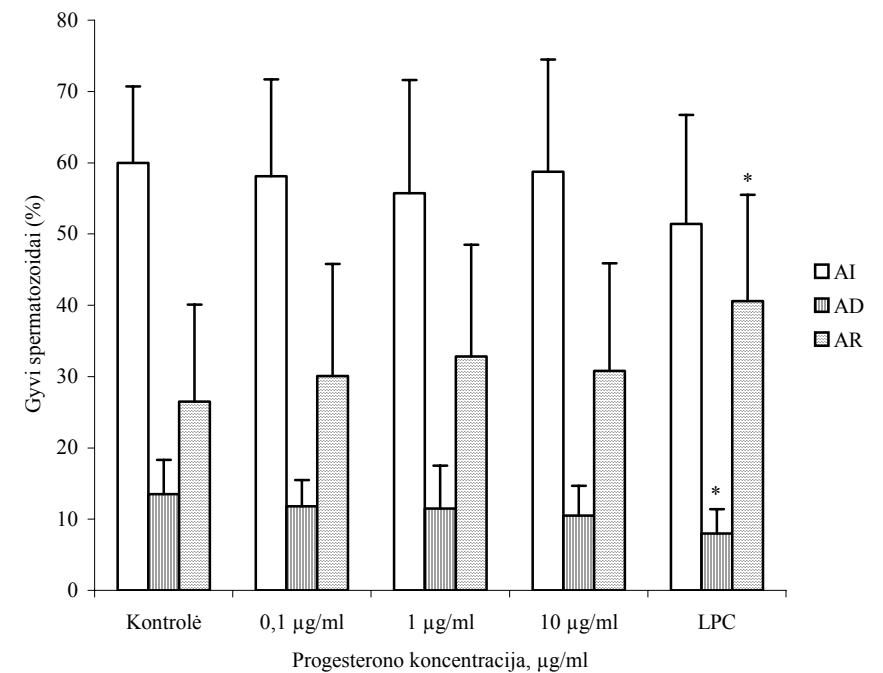


5 paveikslas. Skirtingų progesterono koncentracijų ir 100 µg/ml LPC poveikis į tris skirtingas spermatozoidų kategorijas inkubacijos pradžioje (0 min.), kartu juos inkubuojant 15 min. su akrosominę reakciją skatinančiomis medžiagomis ($n = 4$ buliai). Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinę nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figure 5. The effect of increasing progesterone concentrations and 100 µg/ml LPC on three categories of live spermatozoa following the onset (0 min) of co-incubation with 10 µg/ml heparin, and followed by 15 min incubation with AR-inducing substances, or control samples ($n = 4$ bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates. Means values in the column differ significantly from the control, where * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Lyginant su inkubacijos pradžia, po 240 min. inkubacijos, spermatozoidų skaičius su įvykusiomis akrosominėmis reakcijomis ženkliai padidėjo (6 paveikslas). Mėginiai, inkubuoti su progesteronu, turėjo didesnį skaičių spermatozoidų, su įvykusia akrosomine reakcija nei kontrolėje, tačiau mažiau nei mėginiuose su LPC (6 paveikslas).

Spermatozoidų, su prasidėjusia akrosomine reakcija (AD) kontroliniuose ir su progesteronu inkubuotuose mėginiuose skaičius buvo panašus, bet statistškai patikimai skyrėsi nuo mėginių, inkubuotų su LPC po 240 min. inkubacijos (6 paveikslas). Skirtingų koncentracijų progesteronas turėjo panašų poveikį į akrosominės reakcijos pasireiškimą, tačiau didžiausias skaičius spermatozoidų, su įvykusia akrosomine reakcija buvo mėginiuose, inkubuotuose su 1 µg/ml P (6,3% daugiau spermatozoidų, su akrosomine reakcija nei kontroliniuose mėginiuose, bet 7,8% mažiau nei mėginiuose, inkubuotuose su LPC).

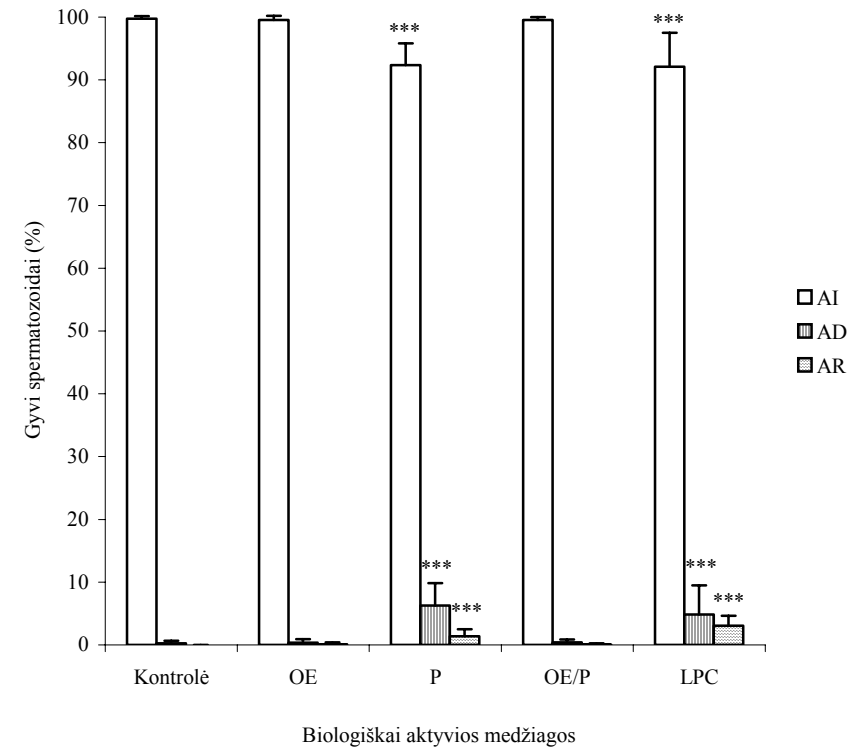


6 paveikslas. Skirtingų progesterono koncentracijų ir 100 µg/ml LPC poveikis į tris skirtingas spermatozoidų kategorijas po 240 min. spermatozoidų inkubacijos su 10 µg/ml heparinu, kartu juos inkubuojant 15 min. su akrosominę reakciją skatinančiomis medžiagomis (n = 4 buliai). Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį ± standartinį nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = p < 0,05.

Figure 6. The effect of increasing progesterone concentrations and 100 µg/ml LPC on three categories of live spermatozoa following 240 minutes of co-incubation with 10 µg/ml heparin, and followed by 15 min incubation with AR-inducing substances, or

control samples (n = 4 bulls). Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates. Means values in the column are not statistically significant, only LPC treated sample differ significantly from the control, where * = $p < 0.05$.

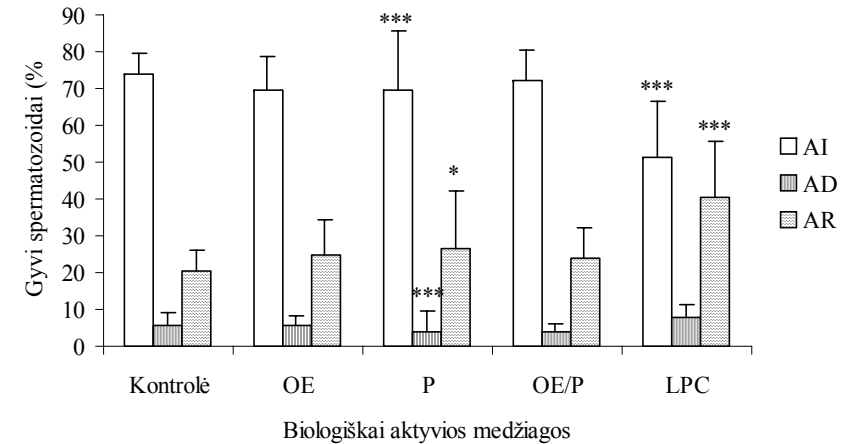
Estradiolio, progesterono ir estradiolio-progesterono poveikis į spermatozoidų akrosominės reakcijos pasireiškimą buvo vertinamas 3 bandyme. Inkubacijos pradžioje buvo tik keli procentai spermatozoidų su prasidėjusia (AD) ir įvykusia akrosomine reakcija (AR) mėginiuose su progesteronu ir LPC (7 paveikslas).



7 paveikslas. Estradiolio, progesterono vienų ar kartu ir 100 $\mu\text{g/ml}$ LPC poveikis į tris skirtingas spermatozoidų kategorijas inkubacijos pradžioje (0 min.), kartu juos inkubuojant 15 min. su akrosominę reakciją skatinančiomis medžiagomis (n = 4 buliai). Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinę nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės *** = $p < 0,001$.

Figure 7. The effect of oestradiol, progesterone alone, or in combination and LPC on sperm acrosomal status of live spermatozoa at the onset (0 min) of incubation (n = 4 bulls). Means in the column differ significantly from the control where *** = $p < 0.001$. Each column represents the mean $\pm$ SD from three replicates.

Po 240 min. inkubacijos, spermatozoidų skaičius su įvykusia akrosomine reakcija ženkliai padidėjo. Mėginiuose su estradioliu, progesteronu, estradioliu-progesteronu ir LPC spermatozoidų, su pasireiškusia akrosomine reakcija skaičius buvo ženkliai didesnis nei kontrolėje (8 paveikslas).



8 paveikslas. Estradiolio, progesterono vienu ar kartu ir 100 µg/ml LPC poveikis į tris skirtingas spermatozoidų kategorijas po 240 min. spermatozoidų inkubacijos su 10 µg/ml heparinu, kartu juos inkubuojant 15 min. su akrosominę reakciją skatinančiomis medžiagomis (n = 4 buliai). Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį ± standartinį nuokrypį trijų pakartojimų. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = p < 0,05; *** = p < 0,001.

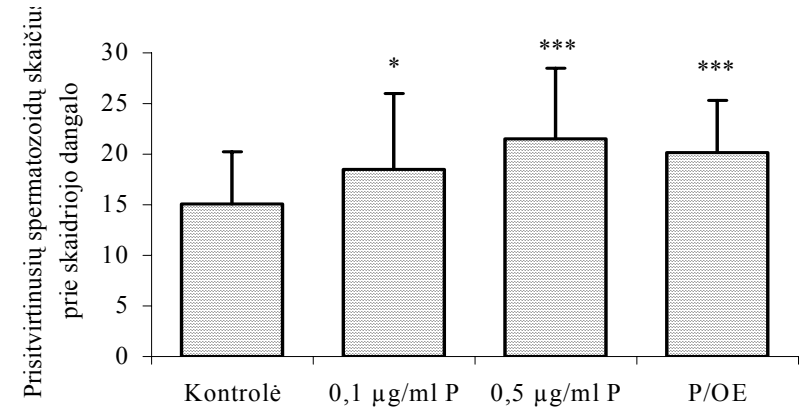
Figure 8. The effect of oestradiol, progesterone alone, or in combination and lysophosphatidylcholine on sperm acrosomal status of live 240 min heparin-capacitated spermatozoa (n = 4 bulls). Means in the column differ significantly from the control where * = p < 0.05; *** = p < 0.001. Each column represents the mean ± SD from three replicates.

Tačiau iš naudotų biologiškai aktyvių medžiagų tik progesteronas (p < 0,05) ir LPC (p < 0,001) turėjo statistiškai patikimą poveikį į akrosominės reakcijos pasireišimą spermatozoiduose (AR) po 240 min. inkubacijos. Mėginiuose, inkubuotuose su progesteronu ir estradioliu-progesteronu, buvo mažiau spermatozoidų, su prasidėjusia akrosomine reakcija (AD) nei kontrolėje. Mėginiuose, inkubuotuose su estradioliu, ir kontroliniuose mėginiuose, spermatozoidų, su prasidėjusia akrosomine reakcija, skaičius buvo panašus (8 paveikslas).

Spermatozoidų sąveika su kiaušialąstės skaidriuuoju dangalu (4 bandymas)

Ketvirto bandymo metu buvo tiriamas progesterono ir progesterono-estradiolio poveikis į spermatozoidų skaičiaus prisitvirtinimą prie skaidriojo dangalo.

Eksperimentinis modelis – biologiškai aktyvios medžiagos ir buliai statistiškai patikimai ($p < 0,05$) įtakojo spermatozoidų prisitvirtinimą prie kiaušialąstės skaidriojo dangalo. Progesteronas statistiškai patikimai įtakojo į didesnę prisitvirtinusių spermatozoidų skaičių prie skaidriojo dangalo (9 paveikslas).



9 paveikslas. Progesterono ir progesterono kartu su estradioliu poveikis į spermatozoidų prisitvirtinimą prie skaidriojo dangalo. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinę nuokrypį. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Figure 9. Effect of progesterone and combination of progesterone and oestradiol on sperm-zona pellucida (ZP) binding. Means significantly differ from control where * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$. Bars represent mean $\pm$ SD.

Skirtingos progesterono koncentracijos panašiai veikė į prisitvirtinusių spermatozoidų prie skaidriojo dangalo skaičių, tačiau didžiausią poveikį turėjo 0,5 µg/ml koncentracijos progesteronas (6,5 prisitvirtinusių spermatozoidų prie skaidriojo dangalo daugiau nei kontroliniuose mėginiuose, $p < 0,001$). Estradiolis statistiškai patikimai ($p < 0,001$) sumažino progesterono poveikį į spermatozoidų prisitvirtinimą prie skaidriojo dangalo (9 paveikslas). Atskirų bulių spermatozoidai skirtingai reagavo į biologiškai aktyvių medžiagų poveikį, jiems sąveikaujant su skaidriu dangalu.

Akrosominės reakcijos pasireiškimas spermatozoidams sąveikaujant su kiaušialąste (5 bandymas)

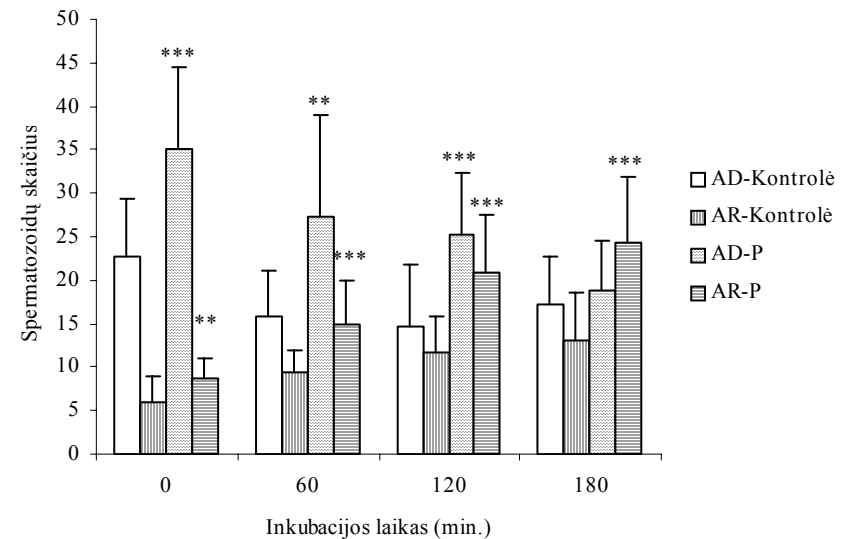
Progesterono poveikis spermatozoidams sąveikaujant su kiaušialąste buvo nustatomas vertinant akrosominės reakcijos pasireiškimą prisitvirtinuosiuose spermatozoiduose (5 bandymas). Inkubacijos pradžioje mėginiuose su progesteronu buvo $43,8 \pm 11,1$ spermatozoidų, prisitvirtinusių prie kiaušialąstės, ir $27,7 \pm 7,8$ spermatozoidai

- kontroliniuose mėginiuose. Prie kiaušialąstės prisitvirtinę spermatozoidai, pagal jų akrosomos būklę, buvo diferencijuojami į dvi kategorijas: spermatozoidai su išburkusia, pažeista akrosoma (AD) ir spermatozoidai, su įvykusia akrosomine reakcija (AR).

Pirmomis inkubacijos valandomis spermatozoidų, su įvykusia akrosomine reakcija, junginiuose su kiaušialąste, skaičius buvo nedidelis, tačiau buvo didesnis mėginiuose, inkubuotuose su progesteronu (10 paveikslas).

Taip pat mėginiuose su progesteronu buvo didesnis skaičius spermatozoidų, su išburkusiomis, pažeistomis akrosomomis (AD) jiems sąveikaujant su kiaušialąste (10 paveikslas).

Progesteronas statistškai patikimai įtakojo į spermatozoidų akrosominės reakcijos pasireiškimą, jiems sąveikaujant su kiaušialąste ($p < 0,001$). Inkubacijos pradžioje progesteronas neturėjo poveikio į akrosominės reakcijos pasireiškimą (11 paveikslas).

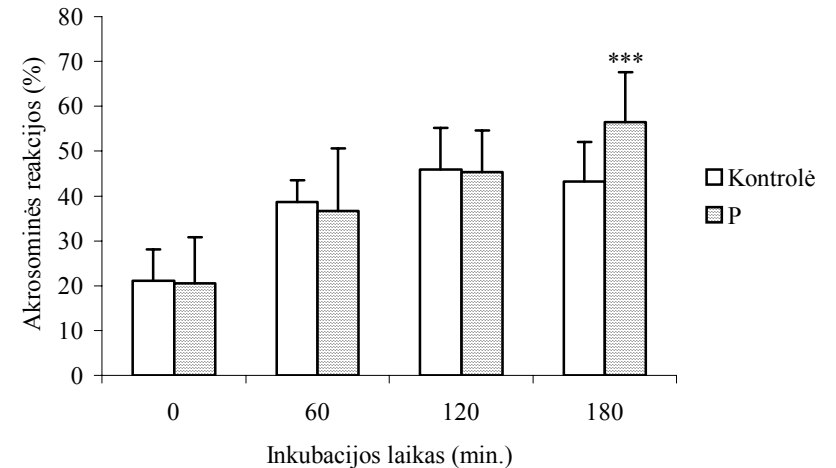


10 paveikslas. Spermatozoidų, su prasidėjusia akrosomine reakcija (AD) ir įvykusia akrosomine reakcija (AR), prisitvirtinimas prie skaidriojo dangalo kontroliniuose ir su progesteronu inkubuotuose mėginiuose skirtingais laiko intervalais. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinį nuokrypį. Rezultatai statistškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Figure 10. The total number of bound AD and AR spermatozoa to the ZP at different time intervals in control and in progesterone treated samples. Bars represent mean $\pm$ SD. Means in the column differ significantly from the control where ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Inkubacijos pradžioje kontroliniuose ir su progesteronu inkubuotuose mėginiuose buvo apie 20% spermatozoidų, su įvykusia akrosomine reakcija (11 paveikslas).

Inkubacijos pabaigoje progesteronas statistiškai patikimai įtakojo į akrosominės reakcijos pasireiškimą spermatozoidų junginiuose su kiaušialąste. Mėginiuose, inkubuotuose su progesteronu, buvo 13,3% daugiau spermatozoidų, su įvykusia akrosomine reakcija nei kontrolėje po 180 min. spermatozoidų ir kiaušialąstės inkubacijos (11 paveikslas).



11 paveikslas. Laiko ir progesterono poveikis akrosominės reakcijos pasireiškimui spermatozoidų kompleksuose su kiaušialąste. Kiekvienas stulpelis parodo vidurkį $\pm$ standartinę nuokrypį. Rezultatai statistiškai patikimai skyrėsi nuo kontrolės *** = $p < 0,001$.

Figure 11. The effect of time and progesterone on the incidences of AR spermatozoa in ZP bound complexes. Bars represent mean $\pm$ SD. Means in the column differ significantly from the control where *** = $p < 0.001$.

IŠVADOS:

1. Sefadex G-15 spermos filtracijos metodas statistiškai patikimai ($p < 0,01$) pagerina bulių spermos morfologinius rodiklius prieš spermos užšaldymą, taip pat statistiškai patikimai ($p < 0,001$) padidina gyvų spermatozoidų ir vientisų akrosomų turinčių spermatozoidų skaičių ($p < 0,05$) po spermos atšildymo.
2. Sefadex G-15 spermos filtracijos metodas neįtakoja spermos kokybiniams rodikliams, tokiems, kaip judrumui ($p > 0,05$), mitochondrijų membranų stabilumui ($p > 0,05$), plazminės membranos destabilizavimui ($p > 0,05$) ir chromatinio vientisumui ($p > 0,05$).
3. Progesteronas, estradiolis ir heparinas vieni ar kartu neturi neigiamo poveikio spermatozoidų gyvybingumui ($p > 0,05$).
4. Progesteronas panaudotomis 0,1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijomis panašiai skatina kapacitacijos procesą atšildytoje bulių spermoje, tačiau didžiausią poveikį kapacitacijai turi 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos progesteronas ($p < 0,01$).

5. Progesteronas 1 µg/ml koncentracijos skatina akrosominės reakcijos pasireiškimą atšildytoje bulių spermoje ($p < 0,05$).

6. Estradiolis pasižymi spermatozoidų plazminės membranos stabilizuojamomis savybėmis atšildytoje bulių spermoje ($p < 0,05$).

7. Estradiolis neįtakoja kapacitacijos ir akrosominės reakcijos pasireiškimo atšildytoje bulių spermoje ($p > 0,05$).

8. Heparinas, kartu su estradioliu, progesteronu ir estradioliu-progesteronu statistiškai patikimai skatina plazminės membranos destabilizaciją atšildytuose bulių spermatozoiduose ($p < 0,001$) lyginant su kitomis naudotomis biologiškai aktyviomis medžiagomis.

9. Progesteronas, panaudotas 0,1 ($p < 0,05$) ir 0,5 ($p < 0,001$) koncentracijų, didina prisitvirtinusių spermatozoidų skaičių prie skaidriojo dangalo, priklausomai nuo naudojamos progesterono koncentracijos.

10. Progesteronas, sinergistiškai su skaidriuoju dangalu, skatina akrosominės reakcijos pasireiškimą kriokonservuotose bulių spermatozoiduose po atšildymo, tačiau tik po 180 min. spermatozoidų ir kiaušialąstės inkubavimo.

PASIŪLYMAI:

1. Spermos kokybė tam tikrais reproduktorių gyvenimo laikotarpiais gali pablogėti, todėl dėl bulių spermos kokybės pagerinimo rekomenduojame taikyti spermos filtraciją Sefadex G-15 metodu.

2. Heparinas ir progesteronas (atskirai ar kartu) gali būti naudojami *in vitro* apvaisinimo protokoluose norint pailginti spermatozoidų gyvybingumą, skatinti jų plazminės membranos destabilizaciją ir kapacitaciją atšildytuose bulių spermatozoiduose bei siekiant padidinti prisitvirtinusių spermatozoidų skaičių prie skaidriojo dangalo.

PUBLIKACIJOS:

1. Lukoseviciute K, Zilinskas H, Januskauskas A, 2004: “Effect of exogenous progesterone on post-thaw capacitation and acrosome reaction of bovine spermatozoa”. *Reproduction in Domestic Animals* 39, 1-8.

2. Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H, 2005: “Assessment of efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation”. *Theriogenology* 63, 160-178.

3. Lukoseviciute K, Zilinskas H, Januskauskas A, 2005: “The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa”. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 1-8.

4. Lukoseviciute K, Januskauskas A, 2003: “Assessment of sperm quality post-thaw and the effect of progesterone on sperm function of dairy AI bull semen” 35-40. *International minisymposium : Farm animal reproduction: Conserving local genetic resources*.

INTRODUCTION

Artificial insemination in cattle has become one of the most important techniques ever devised to propagate genetic improvement through breeding programs. A

prerequisite for the success of this “first-generation” biotechnology is that the semen used for artificial insemination is fertile after cryopreservation. In a successful artificial insemination organization, it is important to obtain high fertility from every semen sample (Graham, 1990). This is especially important when only a few outstanding bulls are used to inseminate a large population of females. Most of the inseminations today are performed with frozen-thawed semen. Cryopreservation, which attempts to prolong storage of spermatozoa, imposes however that even with the best preservation techniques to date survival after thawing is restricted to about 50% of the total sperm population. Irreversible damage occurs to the sperm membranes that causes cell death (Hammerstedt et al., 1990) or capacitation-like changes in the plasmalemma hampering their ability to fertilize (Cormier et al., 1997).

Semen production centres are sometimes confronted with the need to use semen from ejaculates of fertile bulls of high genetic merit that for reasons of age or incidents during their active life show a lower semen quality than previously. Abnormalities in spermatozoa occur either during spermatogenesis, or during final maturation in epididymis. Some bulls may have genetic predisposition to develop abnormal spermatozoa when exposed to adverse environmental influences (Barth and Oko, 1989). Dead and abnormal spermatozoa have adverse effects on companion cells (Linderman et al., 1982; Shannon and Curson, 1972) and consequently on the fertilization potential of the semen (Saacke and White, 1972). All spermatozoa in an ejaculate are not functionally equivalent, but it is not known which attributes differentiate a fertile spermatozoon from an infertile one. Certainly, any one of a number of deficiencies or defects in a spermatozoon can render it infertile and if a sufficiently large proportion of spermatozoa is affected, that sample will be subfertile or might have a very low probability of fertilizing an oocyte (Amann, 1989). Therefore, a long-standing goal of the cattle industry has been to design simple and reliable methods for improving the fertilizing capacity of bovine semen.

Sperm filtration methods separate motile from immotile spermatozoa and remove abnormal and/or dead spermatozoa. There are many semen filtration methods, however, each method has its good features and also its drawbacks. Some of them may induce ultrastructural damage to the outer plasma membrane and acrosome of spermatozoa (Sherman et al., 1981), contaminate the filtrate (Daya and Gwatkin, 1987), require repeated washing and centrifugation (Lessley and Garner, 1983), or yield extremely low numbers of spermatozoa (Daya et al., 1987). Most of these techniques cannot be used with extended semen (Anzar and Graham, 1993). Sephadex G-15 filtration is one of the most operative methods nowadays, which separates motile spermatozoa from immotile and removes abnormal and/or dead spermatozoa, increases number of spermatozoa with intact acrosomes (Anzar and Graham, 1993) and is a simpler and more cost-effective filtration method (Goyal et al., 1996). However, it is still unclear if the Sephadex G-15 filtration method is optimal and suitable for the use of semen production centres for improvement bull semen quality.

Mammalian spermatozoa are not immediately capable of fertilizing oocytes when deposited in the female reproductive tract but first must undergo certain preparatory steps, termed “capacitation” (Austin, 1951). Capacitation is a biochemical phenomenon which includes changes in membrane lipids and proteins, ionic fluxes, increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and protein phosphorylation (Fraser, 1990). Capacitation is also associated with changes in sperm motility, so called hyperactivation,

and with the acquired ability to undergo acrosome reaction after binding to the zona pellucida, a process described by multiple fusion and vesiculation of the outer acrosomal membrane with the overlying plasma membrane (Yanagimachi and Usui, 1974). Only capacitated spermatozoa may bind to the oocyte. Capacitation of spermatozoa, recognition and binding to specific zona pellucida (ZP) receptors and acrosome reaction (AR) are the main and essential requirements for successful fertilization. Any failure will disturb fertilization and spermatozoa would not be able to fertilize the oocyte. Many factors regulate such processes in the female genital tract, and one of the main activators of sperm function is follicular fluid. Follicular fluid contains many biologically active substances such as progesterone, oestradiol and heparin, which are released in high levels during ovulation. There are reports about influence of progesterone, oestradiol and heparin on spermatozoa in various mammalian species, where they induce capacitation, acrosome reaction, or affect spermatozoa-zona pellucida of oocyte binding. However, to date it is lack of information, how progesterone (P), oestradiol (OE) and heparin (Hep) alone or in combination affect on bovine spermatozoa after thawing.

Aim of the study:

Studies were conducted aiming to evaluate the usefulness of bovine semen filtration technique to improve quality of semen used for commercial artificial insemination, and to evaluate the effect of biologically active substances - progesterone, oestradiol and heparin on function of post-thaw bovine spermatozoa.

Pursuing the general aim of the study, the following goals were posed:

- To estimate the efficacy of Sephadex G-15 filtration method of bovine spermatozoa on semen quality parameters before and after cryopreservation;
- To estimate the effect of progesterone on post-thaw bull spermatozoa viability, plasma membrane scrambling, capacitation and AR;
- To estimate the effect of oestradiol, heparin separately or in combination, as well as in combination with progesterone on post-thaw bull spermatozoa viability, plasma membrane scrambling, capacitation and AR;
- To estimate the effect of progesterone and oestradiol on sperm-zona pellucida binding;
- To estimate the effect of progesterone on the incidence of acrosome reaction in the zona pellucida-bound spermatozoa.

Novelty of the study:

It is the first time in Lithuania that practical application of semen filtration by Sephadex G-15 for the needs of artificial insemination industry was assessed. The efficacy of semen filtration was assessed applying a battery of sperm quality assays to study bovine spermatozoa quality before and after filtration, as well as after cryopreservation. The estimation of effect of different concentrations of progesterone, oestradiol, heparin separately or in combination, on different functional parameters of bull spermatozoa after thawing was performed. These are the first published studies

applying integrated approach to study the effects of sperm challenge with several biologically active substances.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design:

The following experiments were carried out:

Experiment 1: Assessment of efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa on semen quality parameters before and after cryopreservation;

Experiment 2: Assessment of progesterone effect on post-thaw bull spermatozoa viability, plasma membrane scrambling, capacitation and acrosome reaction;

Experiment 3: Assessment of the effect of oestradiol, heparin separately or in combination, as well as in combination with progesterone on post-thaw bull spermatozoa viability, plasma membrane scrambling, capacitation and acrosome reaction;

Experiment 4: Assessment of progesterone and oestradiol effect on sperm-zona pellucida binding;

Experiment 5: Assessment of progesterone effect on the incidence of acrosome reaction in the zona pellucida bound spermatozoa.

Sephadex filtration (Experiment 1)

The semen for sperm filtration study (Experiment 1) was collected by means of artificial vagina from five dairy artificial insemination bulls. Semen was divided into two aliquots – one for Sephadex filtration and the other (not filtered) served as control. After filtration, semen was packed into 0.25 ml commercial plastic straws and frozen in a programmable freezing chamber (Digitcool 5300, IMV Technologies, L'Aigle, France). The straws were then transferred to LN₂ for storage until evaluation.

Not filtered and filtered sperm motility evaluations were performed at three different stages of the cryopreservation protocol: after final dilution (PD), after equilibration, prior freezing (PE), after freezing and thawing (PT) with a computer-assisted motility analyzer (CASA, SM-CMA, Strömberg-Mika, Bad Feilnbach, Germany). Sperm morphology was assessed after staining with eosin-aniline blue (Shaffer and Almquist, 1948) and the samples included both air-dried smears and semen fixed in a buffered formalin-saline solution (Hancock, 1957) by light microscopy at × 1000.

Not filtered and filtered sperm parameters were assessed by flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Sperm viability with SYBR-14/PI, sperm mitochondrial membrane potential with Mitotracker Deep Red/SYBR-14, sperm acrosomal integrity with SYBR-14/PE-PNA/PI, sperm plasma membrane stability with Merocyanine 540/Yo-PRO 1/Hoechst 333542, sperm chromatin stability with acridine orange were measured.

Experiments 2 and 3

Sperm capacitation with biologically active substances

Two mini-straws from each bull were thawed in water bath at 38°C. Semen was then pooled in a pre-warmed tube and re-suspended with 2 ml of pre-warmed (37°C) culture medium, and centrifuged twice (5 min at 600 × g) at room temperature. Spermatozoa were incubated in the presence of final concentration of 0, 0.1, 1 and 10 µg/ml progesterone (Experiment 2) or a) 1 µg/ml OE; b) 1 µg/ml P; c) 1 µg/ml OE and 1 µg/ml P; d) 1 µg/ml OE and 5 µg/ml Hep; e) 1 µg/ml P and 5 µg/ml Hep; f) 1 µg/ml OE, 1 µg/ml P and 5 µg/ml Hep (Experiment 3) at 39°C in a humidified atmosphere saturated with 5% CO₂. At determined time intervals of 0, 60, 120 and 180 min following addition of biologically active substances, 45µl sub-samples were taken and co-incubated at 39°C in a 5% CO₂ for 15 min with 5µl lysophosphatidylcholine at a final LPC concentration of 100 µg/ml. To induce the acrosome reaction in capacitated spermatozoa without affecting motility or initiating an acrosome reaction in noncapacitated cells LPC was used (Parrish et al., 1988). The final sperm concentration in experiments 2 and 3 was 5×10⁶ spermatozoa/ml.

Sperm AR induction with biologically active substances

Spermatozoa were pre-incubated in SP-TALP supplemented with 10 µg/ml heparin to initiate sperm capacitation and maintained at 39° C in a humidified atmosphere saturated with 5% CO₂ until use. Sub-samples were taken for the analysis immediately after heparin addition (time 0), and following 240 min, of incubation. The acrosome reaction was induced by 0.1, 1, 10 µg/ml of progesterone (Experiment 2) or by 1 µg/ml of OE; 1 µg/ml of P or OE mixed with P, both at 1 µg/ml concentration (Experiment 3) and incubated for 15 min. Lysophosphatidylcholine at a concentration of 100 µg/ml served as positive control. The final sperm concentration in experiments 2 and 3 was 5×10⁶ spermatozoa/ml.

Assessment of spermatozoa

Sperm plasma membrane scrambling was assessed by flow cytometer with Merocyanine 540/Yo-PRO 1. A combination of two fluorescent dyes (EthD-1 and PNA-FITC) was used in order to assess the acrosomal status of spermatozoa and to differentiate live spermatozoa from the dead. To estimate the proportion of acrosome reactions in spermatozoa, 200 spermatozoa were assessed in randomly selected fields under an epifluorescence microscope (CETI, Kontich, Belgium). Classification was based on dye exclusion. For this, spermatozoa with an EthD-1-stained nucleus were classified as nonviable, and those with a non-stained nucleus were classified as alive. Spermatozoa were considered to have an intact acrosome if the PNA-FITC staining was distributed over the entire acrosome (AI). Patchy-like, disrupted PNA-FITC fluorescence of acrosome indicated that the AR was in process (AD). Spermatozoa with PNA-FITC staining on the equatorial segment had completed the AR and had shed the outer acrosomal membrane (AR).

Sperm-zona pellucida binding

Sperm-zona pellucida binding assay (Experiment 4)

Oocytes were incubated with sperm suspension after swim-up and three hours incubation in Fert-TALP medium containing vehicle control or in culture medium containing following combinations of hormones of final concentrations: a) 0.1 µg/ml P; b) 0.5 µg/ml P; c) 0.5 µg/ml P and 0.1 µg/ml OE for 1 h at 39°C in a humidified atmosphere saturated with 5% CO₂. Following the incubation, the sperm-oocyte complexes were stained with Syto-16 green. The total number of spermatozoa attached to the zona pellucida was counted with epifluorescence microscope (CETI, Kontich, Belgium) at ×250 magnification, using blue (310-480/500-780 nm - excitation/barrier) compositional filter.

Assessment of acrosome reaction in zona pellucida bound spermatozoa (Experiment 5)

Sperm suspension after swim-up and three hours incubation in Fert-TALP medium were incubated with five oocytes and supplemented with 0.1% DMSO (v/v) (control) or Fert-TALP medium containing 1 µg/ml progesterone - test samples. Following 1 h of incubation at 39°C in a humidified atmosphere saturated with 5% CO₂, the sperm-oocyte complexes were removed, rinsed and transferred to Fert-TALP containing 0.1% DMSO (v/v), and test samples were transferred to droplets containing 1 µg/ml progesterone and further incubated at 39°C in a humidified atmosphere saturated with 5% CO₂. At predetermined time intervals of 0, 60, 120, or 180 min complexes were stained with EthD-1 and PNA-FITC. The acrosome status of spermatozoa bound to zona pellucida was assessed.

RESULTS

Efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa on semen quality parameters before and after cryopreservation (Experiment 1)

Mean concentration of spermatozoa in ejaculated semen was $1.85 \pm 0.2 \times 10^9$ cells/ml. Semen was thereafter extended to $369.5 \pm 0.2 \times 10^6$ cells/ml. Following semen filtration, mean concentration of spermatozoa was reduced them 1/3 to $227.3 \pm 0.1 \times 10^6$ cells/ml, ($p < 0.01$). (Table 1).

Mean initial sperm motility values after semen collection were $83.3 \pm 7.6\%$. Filtration did not have a significant effect ($p > 0.05$) on sperm motility or motion characteristics in extended semen (PD). In equilibrated semen (PE), the only parameter significantly ($p < 0.05$) improved by semen filtration was the percentage values of motile spermatozoa (MOT). Other sperm motion-related parameters were improved, but the difference was not statistically significant. In samples after thawing (PT), only percentage values of motile spermatozoa (MOT) were significantly improved by semen filtration (Table 1).

Morphological abnormalities of spermatozoa were assessed in samples after final dilution, before equilibration. Filtration significantly improved semen quality, reducing various forms of morphological defects. Some defects, such as incidence of total sperm

tail abnormalities and tail-less (loose) heads, however, were not affected by filtration (Table 2).

The mean percentage of spermatozoa with intact membranes after thawing was significantly ($p < 0.05$) higher in filtered semen samples ($41.2 \pm 3.7\%$) as compared to non-filtered samples ($34.8 \pm 3.8\%$).

Filtration had no effect on mitochondrial membrane potential in frozen-thawed spermatozoa. On average, filtered samples contained $38.9 \pm 2.4\%$ of spermatozoa depicting high mitochondrial potential (brightly stained), and in non-filtered samples these values accounted for $34.9 \pm 2.3\%$. The difference averaged to 4% and was not statistically significant ($p > 0.05$).

The mean number of live spermatozoa with intact acrosomes was higher in filtered samples ($37.7 \pm 3.7\%$) as compared to non-filtered samples (32.2 ± 3.8). On the average, there were $2.0 \pm 0.2\%$ and $2.3 \pm 0.2\%$ live spermatozoa with damaged acrosomes in non-filtered and filtered samples, respectively.

On average, the mean number of live spermatozoa was $32.7 \pm 2.6\%$ and $38.1 \pm 2.6\%$ in non-filtered and filtered samples, respectively. Of these, only $0.3 \pm 0.1\%$ and $0.2 \pm 0.1\%$ showed high fluorescence with Merocyanine-540 (Mero high) in non-filtered and filtered samples, respectively, and were depicting cells with higher lipid disorder.

In sperm samples assessed, only few percent spermatozoa contained DNA-breaks. On average, filtered samples contained $3.1 \pm 0.5\%$ ($\text{COMP}(\alpha_i)$) of spermatozoa with DNA-breaks and in non-filtered samples these values accounted for $3.0 \pm 0.4\%$ ($\text{COMP}(\alpha_i)$).

The effect of biologically active substances on post-thaw spermatozoa (Experiments 2-3)

Sperm plasma membrane scrambling

The effects of progesterone (P) on bovine spermatozoa post-thaw were studied according to the induction of its influence on plasma membrane scrambling and capacitation (Experiment 2). As determined by EthD-1 exclusion, at the beginning of incubation, there were on average (mean $\pm$ SD) $58.0 \pm 11.0\%$ viable spermatozoa. Following a 3-hour-long incubation in capacitating medium, sperm viability decreased progressively to a $43.8 \pm 6.5\%$ level. Samples, incubated with progesterone, had slightly higher percent of viable spermatozoa compared to that of controls, but the effect of progesterone on sperm viability was not statistically significant ($p > 0.05$, Table 3). There was no significant effect of P concentration on sperm viability among different concentrations of P tested (Table 3).

Flow cytometric evaluation revealed that among the bulls evaluated, there was no clear dose-dependent effect of progesterone on sperm plasma membrane scrambling (Figure 1). Sperm plasma membrane scrambling was clearly time dependent. During the first 60 min of incubation, there was on average a 3.1-fold increase in numbers of high mero-binding spermatozoa, presenting higher state of scrambled plasma membranes. The obtained values remained high throughout the rest of incubation period. Among the concentrations of progesterone used, $10 \mu\text{g/ml}$ P resulted in the highest effect on sperm plasma membrane scrambling. Nevertheless, within each incubation time, the effect of P on plasma membrane scrambling was not statistically significant ($p > 0.05$). Semen

samples from individual bulls varied considerably in the percentage of spermatozoa showing rapid increase in merocyanine stainability in response to progesterone treatment.

In experiment 3, bovine spermatozoa post-thaw were affected by oestradiol (OE), heparin (Hep), progesterone (P) or a combination of these substances. At the beginning of incubation, there were on average (mean $\pm$ SD) 63.4 ± 6.9 % viable spermatozoa. Following a 3-hour-long incubation in capacitating medium, sperm viability decreased progressively to 40.7 ± 6.0 %. Samples, incubated with OE, P alone or in combination, expressed slightly higher percentage of viable spermatozoa compared to that of controls, however, their effect on sperm viability was not statistically significant ($p > 0.05$) (Table 4).

Similarly to previous study (Experiment 2), flow cytometric assessment revealed that increase in merocyanine stainability was time-dependent. During the first 60 min of incubation numbers of spermatozoa presenting scrambled plasma membranes increased. The effects of oestradiol and progesterone differed in their action on sperm plasma membrane scrambling. At 60 and 120 min of incubation time, oestradiol, as compared to the control, expressed membrane stabilizing properties ($p < 0.05$), however progesterone addition did not affect ($p > 0.05$) the percentage of spermatozoa with destabilized membranes, when compared with the control. Inclusion of oestradiol to progesterone-containing samples alleviated the membrane-destabilizing effects of progesterone. On the other hand, heparin resulted in a 3-fold increase in numbers of spermatozoa expressing scrambled plasma membranes, as compared to the controls ($p < 0.001$). In this respect, heparin abolished membrane-stabilizing effects of oestradiol and sustained high ratio of spermatozoa with destabilized plasma membranes throughout the rest of incubation time (Figure 2). Incidences of spermatozoa with spontaneous membrane scrambling were comparatively low throughout the incubation. There was a significant effect ($p < 0.001$) of bull on sperm plasma membrane destabilization.

Semen samples from individual bulls varied considerably in the percentage of spermatozoa showing rapid increase in merocyanine stainability in the response to biologically active substances treatment.

Sperm capacitation

The experimental model included fixed effects of incubation time, concentration of progesterone and bull's had significant ($p < 0.001$) effect on the incidences of capacitated spermatozoa, as revealed by LPC-induced acrosome reactions (Experiment 2). In the present context, AR induced by LPC was used as indirect method to measure sperm capacitation, as LPC induces AR only in capacitated spermatozoa. Acrosomal status was assessed only on viable spermatozoa. For this, spermatozoa were differentiated into three categories according to their acrosome status – spermatozoa with intact acrosome (AI), spermatozoa with swollen, patchy-like, disrupted acrosome (AD) and spermatozoa with undergone acrosome reaction (AR). There was a significant ($p < 0.001$) effect of time on sperm capacitation. Following incubation, a number of capacitated spermatozoa, expressed as live acrosome-reacted (AR), increased in all samples, irrespectively to progesterone treatment (Figure 3). There was a significant increase ($p < 0.05$) in capacitated spermatozoa already at 60 min after initiation of co-incubation with progesterone (Figure 3). Thereafter, throughout the rest of the incubation, values steadily increased and the highest incidences of capacitated spermatozoa (AR induced by LPC

treatment) were observed at 180 min of incubation. Within each incubation time, progesterone significantly affected sperm capacitation, expressed as incidences of acrosome-reacted spermatozoa, however capacitation rate was not P concentration dependent (Figure 3). Among the concentrations of progesterone used, the highest effect on sperm capacitation had 10 µg/ml P that capacitated on average 11.6% more spermatozoa than it was observed in the control samples following 180 minutes of incubation (Figure 3). Bulls differed significantly ($p < 0.001$) in the response of their spermatozoa to progesterone.

The experimental model including fixed effects of incubation time, biologically active substances, such as oestradiol, heparin alone or in combination, as well as in combination with progesterone, and bulls was significant ($p < 0.001$) with regard to sperm capacitation, revealed as LPC-induced acrosome reactions (Experiment 3). There was a significant effect ($p < 0.001$) of time on sperm capacitation. Following incubation, numbers of capacitated spermatozoa, expressed as live acrosome-reacted (AR), increased in all samples, irrespectively to treatment, as shown in Figure 4. There was a significant increase in numbers of capacitated spermatozoa already 60 min after initiation of co-incubation, but the only substance having significant effect on sperm capacitation was progesterone. Thereafter, throughout the rest of the incubation, values of the capacitated spermatozoa steadily increased in all samples and the highest incidences of capacitated spermatozoa (AR induced by LPC treatment) were observed at 180 min of incubation (Figure 4). Biologically active substances affected sperm capacitation to a similar rate, just progesterone slightly increased capacitation rate than others (Figure 4). However supplementation of heparin did not significantly increase the effect of progesterone or oestradiol on sperm capacitation. However, the response of spermatozoa of each bull to biologically active substances differed.

Sperm acrosome reaction (AR)

In experiment 2 the effect of progesterone, as acrosome reaction-inducing substance was tested. Live spermatozoa were differentiated into three categories according to the acrosome status. Among the substances tested, lysophosphatidylcholine ($p < 0.05$), but not progesterone affected the rate of acrosome reaction. At the onset of incubation with heparin, there were just a few percent of spermatozoa with undergoing acrosome reaction (AD) and also able to acrosome react (AR) at the stimulation of the effectors. However, most of spermatozoa were acrosome intact (AI) (Figure 5). The incidences of acrosome reacted (AR) spermatozoa was markedly increased following 240 min of incubation (Figure 6). Nevertheless, samples, incubated with progesterone, had less acrosome-intact (AI) spermatozoa compared to those of control samples, but more than samples incubated with LPC (Figure 6). Incidences of spermatozoa undergoing acrosome reaction (AD) in control samples did not differ from the samples treated with progesterone, but differed significantly ($p < 0.05$) from LPC-treated samples. Spermatozoa, incubated with P showed higher incidences of AR than controls, but less than samples, incubated with LPC (Figure 6). There was no concentration-dependent effect of progesterone on the incidences of live acrosome-reacted spermatozoa but the highest incidence of acrosome reactions was observed in 1 µg/ml P treated samples (6.3% higher than controls but 7.8% less than LPC-treated samples).

The effect of oestradiol (OE), progesterone (P) and a combination of both (OE/P) was tested on stimulation of sperm AR in experiment 3. At the onset of incubation with heparin, there were just a few percent of spermatozoa able to undergo acrosome reaction (AD) and acrosome-react (AR) to the stimulation of the effectors, such as progesterone and LPC. Still, progesterone and LPC induced AR at low, but still statistically significant levels (Figure 7). The incidences of responsive spermatozoa were markedly increased following 240 min of incubation with heparin (Figure 8). At this stage, compared to the control samples, incidences of AR spermatozoa in oestradiol, progesterone, oestradiol-progesterone- and LPC-treated samples were significantly higher compared to these of the controls. Among the samples tested, LPC ($p < 0.001$) and progesterone ($p < 0.05$) affected significantly the rate of AR. Samples, incubated with progesterone, had less acrosome-intact spermatozoa compared to those of control samples, but more than samples incubated with LPC (Figure 8). Compared to the controls, there were significantly lower incidences of spermatozoa undergoing acrosome reaction (AD) in progesterone or oestradiol with progesterone - treated samples. In samples, treated with oestradiol alone, incidence of spermatozoa undergoing acrosome reaction (AD) was similar to that of controls (Figure 8).

Sperm-zona pellucida binding

Sperm-zona pellucida binding (Experiment 4)

The effect of progesterone and combination of progesterone and oestradiol was studied on the number of bound spermatozoa to the zona pellucida (ZP) (Experiment 4). Progesterone significantly ($p < 0.001$) increased the number of bound spermatozoa (Figure 9). There was no concentration-dose dependent effect of progesterone on the number of bound spermatozoa, however the highest effect on the number of ZP-bound spermatozoa had 0.5 µg/ml of progesterone (6.5 bound spermatozoa more than in control samples, $p < 0.001$). Oestradiol significantly alleviated the effect of progesterone on sperm-ZP binding ($p < 0.001$) (Figure 9).

Incidence of acrosome reaction in the zona bound spermatozoa (Experiment 5)

The effect of progesterone on the zona pellucida-bound spermatozoa was studied through its influence on the induction of acrosome reaction (Experiment 5). Before spermatozoa–oocyte complexes co-incubation at predetermined time intervals, oocytes were incubated with spermatozoa for 1 h. At the beginning of co-incubation, there were on average (mean $\pm$ SD) 43.8 ± 11.1 bound spermatozoa in progesterone treated samples and 27.7 ± 7.8 bound spermatozoa in controls. This value remained during all incubation time. The fixed effects such as progesterone ($p < 0.001$) and bull ($p < 0.01$) had significant effect on the number of bound spermatozoa to the ZP. All bound spermatozoa were differentiated into two categories according to their acrosome status – live spermatozoa with swollen, patchy-like, disrupted acrosome (AD) and live spermatozoa with undergone acrosome reaction (AR). During the first hours of co-incubation the number of AR spermatozoa was low, however it was higher in progesterone treated samples (Figure 10). Similarly, the number of undergoing acrosome reaction spermatozoa (denoted as AD) was more in sperm-ZP bound complexes incubated with progesterone

(Figure 10). Progesterone significantly affected the rate of AR in spermatozoa ($p < 0.01$). However, during the first hours of co-incubation progesterone had no effect on the incidence of AR (Figure 11). Only at the onset of incubation approximately 20% of all spermatozoa were AR in control and progesterone treated samples, though the ratio steadily increased throughout the rest of incubation (Figure 11). The percentage of spermatozoa undergoing acrosome reaction (AD) was higher than spermatozoa with undergone AR and respectively, the rate of AD spermatozoa progressively decreased during incubation. Though at the end of incubation progesterone significantly ($p < 0.001$) raised the incidence of AR in spermatozoa. After 180 min of co-incubation the percentage of AR spermatozoa was 13.3% more in progesterone treated sperm-oocytes complexes than in controls (Figure 11).

CONCLUSIONS:

1. The Sephadex G-15 filtration technique improves significantly sperm morphology ($p < 0.01$) prior freezing, enhances significantly sperm viability ($p < 0.001$) and acrosomal membrane integrity ($p < 0.05$) after thawing in bovine spermatozoa.
2. Sephadex G-15 filtration has no effect on semen quality with respect to motility ($p > 0.05$), mitochondrial activity ($p > 0.05$), plasma membrane destabilization ($p > 0.05$) and chromatin stability ($p > 0.05$).
3. Progesterone, oestradiol and heparin separately or in combination do not negatively affect sperm viability ($p > 0.05$).
4. Progesterone at 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ concentrations induce capacitation in post-thaw bovine spermatozoa at a similar rate. However, the highest rate of capacitation is induced by 10 $\mu\text{g/ml}$ of progesterone ($p < 0.01$).
5. Progesterone at 1 $\mu\text{g/ml}$ dose stimulates acrosome reaction ($p < 0.05$) in frozen-thawed bovine spermatozoa.
6. Oestradiol presents plasma membrane stabilizing properties in post-thaw bovine spermatozoa ($p < 0.05$).
7. Oestradiol has no effect on sperm capacitation and acrosome reaction of post-thaw bovine spermatozoa ($p > 0.05$).
8. Heparin in combination with oestradiol, progesterone and oestradiol-progesterone significantly promote plasma membrane scrambling in post-thaw bovine spermatozoa ($p < 0.001$) as compared to other biologically active substances used.
9. Progesterone of 0.1 ($p < 0.05$) and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$) concentrations used, increase the number of bound spermatozoa to zona pellucida at a concentration-dependent base.
10. Progesterone induces acrosome reaction synergistically with zona pellucida in post-thaw bovine spermatozoa only after prolonged 180 minutes co-incubation of spermatozoa-zona pellucida ($p < 0.001$).

SUGGESTIONS:

1. Bovine sperm filtration by Sephadex G-15 may be used for routine artificial insemination work to improve lower quality ejaculates of bulls. Sephadex G-15 filtration procedures may be applied to cleanse semen from bulls with proven semen quality that could have suffered changes during their life only.

2. Heparin and progesterone alone or in combination may be included in *in vitro* fertilization protocols, as they can prolong sperm viability, as well as promote sperm plasma membrane scrambling and capacitation in post-thaw bovine spermatozoa and to increase the number of spermatozoa bound to zona pellucida.

TRUMPOS ŽINIOS APIE AUTORIŲ:

Kristina Lukoševičiūtė gimė 1978 m. Druskininkuose. Baigusi Druskininkų Atgimimo mokyklą 1996 m. tais pačiais metais įstojo į Lietuvos veterinarijos akademijos veterinarijos fakultetą. Aukštojo mokslo diplomas įgytas 2001 m. Įstojo į Lietuvos veterinarijos akademijos neužkrečiamų ligų katedros doktorantūros studijas Gyvulių reprodukcijos laboratorijoje. Doktorantūros studijų metais vyko stažuotis į Švedijos žemės ūkio universitetą.