



УДК 636.4:612.616:57.086.13

ЯКІСТЬ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ КНУРІВ ЗАЛЕЖНО ВІД СПОСОБІВ ЇЇ ЗАМОРОЖУВАННЯ

Корбецька О. О., м.н.с.

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Наведено результати вивчення впливу різних способів заморожування на якість деконсервованої сперми кнурів. Встановлено, що кріоконсервація сперми кнурів у програмному заморожувачі забезпечила вищу активність спермійів і цілісність плазматичних мембран після деконсервації в порівнянні з заморожуванням в азотній ванні. Однак, окремі кінематичні показники спермійів (VAP, VSL і VSL) були нижчими, ніж при швидкому заморожуванні у в азотній ванні.

Ключові слова: сперма, кнур, заморожування, програмний заморожувач, азотна ванна, деконсервація.

Важливим технологічним прийомом у свинарстві є відтворення і селекція тварин, одним зі способів інтенсифікації якого є штучне осіменіння, що є важливим інструментом для покращення світової популяції свиней [1, 2].

Режим охолодження та відтавання є найбільш критичним і значно впливає на кріовиживання спермійів і є визначальним для розробки оптимального методу кріоконсервації сперми. Більше того, спермії від різних видів неоднаково реагують на заморожування-відтавання, вимагаючи індивідуального підходу до кожного з них. Встановлення швидкості проникності води, використовуючи диференційну скануючу колориметрію, підтвердило, що оптимальною швидкістю заморожування для сперми кнурів є 30 °С/хв при використанні стандартних концентрацій гліцерину [3]. Проте, досліджень з вивчення впливу розморожування на кріовиживання спермійів недостатньо. Відомо, що відповідь або реакція спермійів на відтавання залежить від використаної швидкості охолодження. При охолодженні зі швидкістю 30 °С/хв, швидке відтавання при 1200 °С/хв забезпечило найвищі результати [4]. Використовуючи ці режими, охолодження і відтавання, прийнятне виживання сперми після кріоконсервації (>50 %) забезпечується у більшості кнурів [4, 5].

Для заморожування сперми кнурів у дослідних лабораторіях, як правило, використовують високовартісні програмні заморожувачі суспензій клітин. Однак, це не сприяє розповсюдженню і популяризації використання кріоконсервованої сперми кнурів і вимагає пошуку шляхів здешевлення технології і, зокрема, заморожування сперми. Тому, вивчення якості сперми кнурів після заморожування в програмному заморожувачі та заморожування в парах азоту є актуальним. Використання біологічних заморожувачів для кріоконсервації сперми кнурів є достатньо обмеженим і заморожування в соломинках, як правило, проводиться шляхом розміщення соломинок горизонтально на різних відстанях від поверхні рідкого азоту чи опущення соломинок всередину посудини Дьюара в кілька етапів. Хоча на сьогодні, найбільш прийнятною швидкістю заморожування сперми кнурів є ~ 30 °С /хв, проте результати різних досліджень важко порівнювати тому, що експерименти ніколи не є однаковими, а різниця полягає у складах середовищ, поетапності додавання гліцерину, комбінації кінцевої концентрації чи температури розморожування [6,7,8].

Метою наших досліджень було вивчення якості деконсервованої сперми кнурів залежно від способів заморожування (у програмному заморожувачі і



азотній ванні), порівнюючи їх результативність по показниках характеру руху, активності та збереженості плазматичної мембрани.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проведені у Львівському НВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. У досліджах використовували сперму шістьох клінічно здорових статевозрілих кнурів віком 2-5 р., живою масою 200–340 кг, порід – велика біла (2), п'єтрен (1), ландрас (2), гемпшир (1), що утримувались на сухому збалансованому раціоні. Сперму відбирали мануально на чучело з режимом використання 2 рази на тиждень. Для досліджень використовували тільки першу та другу фракції еякуляту. Після взяття сперма поміщалась в термоконтейнер, та впродовж 60-80 хв доставлялася в лабораторію для оцінки та подальшої технологічної обробки.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), активністю (%) та концентрацією спермійв. Для заморожування відбирали еякуляти з концентрацією спермійв не менше 200 млн/мл, з активністю не менше 70 % і з кількістю патологічних форм не більше 15 %.

Перед заморожуванням розбавлену, охолоджену (5 °С) та витриману (180 хв) сперму фасували в соломинки об'ємом 0,5 мл (IMV, Франція). Вільний кінець запаювали пристроєм для запайки соломинок (Maestro, Китай). Половину соломинок, отриманих з кожного еякуляту, розміщували горизонтально на решітці в азотній ванні на 5 см над поверхнею рідкого азоту впродовж 20 хв, після чого занурювали у рідкий азот і переносили в посудину Дьюара для подальших досліджень. Другу половину соломинок поміщали в тримачі програмного заморожувача клітин Cell Freezer R204 (Planer, Великобританія) і розташовували в камеру заморожувача, в якій попередньо налаштована стартова температура 5 °С. Заморожували в камері за режимом: від 5 °С до мінус 6 °С при мінус 3 °С/хв, при мінус 6 °С утримували 60 с та від мінус 6 °С до мінус 140 °С при мінус 20 °С/хв. Після завершення програми, соломинки переносили з камери заморожувача в пінополістиролову ванну з рідким азотом і переносили в посудину Дьюара для зберігання та подальших досліджень.

Відтавання зразків сперми проводили у водяному термостаті при 37 °С упродовж 30 с. Після розморожування соломинки насухо витирали фільтрувальним папером від води і вмістиме переносили в пробірки та додавали середовище для розморожування.

Рухливість спермійв визначали нанесенням краплі сперми на попередньо підігріте предметне скло, накривали покривним скельцем на підігрівному столику (з температурою 37 °С) методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 (ЛОМО, СРСР) при збільшенні $\times 400$. Активність спермійв виражали у відсотках спермійв з прямолінійним поступальним рухом від загальної кількості.

Об'єктивну оцінку характеру руху спермійв проводили в Львівському НВЦ «Західплемресурси» на системі Sperm Vision (Minitube, Німеччина). За допомогою даної системи проводили автоматичне визначення рухливості спермійв, об'єктивну і оптимальну за часом можливість визначення якості сперми. Автоматичним дозатором після розморожування відбиралось 20 мкл сперми і поміщалося в камеру Leja (IMV, Aigle, Франція), яка попередньо була підігріта до 37 °С. Дослідження рухливості деконсервованих спермійв проводили під мікроскопом Olympus (Японія), методом позитивного фазового контрасту, при збільшенні $\times 200$. П'ять полів зору були вибрані на поверхні камери, і вираховували середній результат. Швидкість камери налаштовували на 20 кадрів в секунду [9, 10].



Цілісність плазматичних мембран визначали тестом гіпоосмотичного набрякання спермійв (ТГОНС), а саме: у пробірку вносили 10 мкл досліджуваної сперми і 100 мкл гіпотонічного розчину, перемішували і ставили в термостат при 37 °С на 30 хв [11]. Досліджували на фазово-контрастному мікроскопі при загальному збільшенні $\times 400$. Підраховували щонайменше 200 спермійв, ділячи їх на дві групи: спермії з закрученими хвостами (з неушкодженими мембранами) і спермії з рівними хвостами (з ушкодженими мембранами), виражаючи другі у відсотках.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм Statistica 8 (StatSoft, США).

Результати досліджень. Одразу після заморожування, як і на кожному етапі дослідження, була проведена оцінка активності спермійв упродовж інкубації після деконсервації, порівнюючи два способи заморожування. Динаміка зниження активності спермійв після використання двох способів заморожування різнилася на 4,6-9,1 %, з повільнішою динамікою зниження активності при використанні програмного заморожувача (табл. 1). Індивідуальні особливості кожного кнур-донора сперми та кореляція між особливостями кнурів та методом заморожування була вірогідна протягом всього періоду інкубації ($r = 0,91$; $p < 0,05$).

Таблиця 1

Активність спермійв після деконсервації та упродовж 8 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M \pm m

Спосіб заморожування	Тривалість інкубації після деконсервації, год								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Азотна ванна	62,7 \pm 5,2	43,2 \pm 6,8	42,8 \pm 6,2	34,1 \pm 6,4	29,3 \pm 6,3	28,5 \pm 6,9	15,6 \pm 5,2	9,0 \pm 3,8	5,0 \pm 2,9
Програмний заморожувач	68,7 \pm 4,8	50,9 \pm 6,2	51,5 \pm 7,4	43,1 \pm 6,0	30,2 \pm 7,3	28,4 \pm 6,5	20,0 \pm 6,2	16,1 \pm 6,3	6,3 \pm 2,9

Дослідженнями кінематичних показників розморожених спермійв встановлено, що одразу після деконсервації загальна активність спермійв була вірогідно вищою у зразках, заморожених у програмному заморожувачі, тоді як кількість спермійв з прямолінійно-поступальним рухом (ППР), хоча і була вищою, але не мала вірогідної різниці, ($p < 0,05$; табл. 2).

На відміну від цього показники VAP, VSL і VCL були вірогідно вищі у зразках, заморожених в азотній ванні ($p < 0,05$). Показники BCF, STR і LIN вірогідно не відрізнялися між двома способами заморожування ($p > 0,05$). Після 2 год інкубації показники VAP, VSL і VCL були вірогідно вищими ($p < 0,05$) при заморожуванні сперми кнурів в азотній ванні порівняно з використанням програмного заморожувача. У той же час активність спермійв при застосуванні заморожувача була на 19,8 %, а кількість спермійв з ППР – на 19,2 % більша, ніж при заморожуванні сперми в азотній ванні. За іншими параметрами спостерігали аналогічну тенденцію, яка була після розморожування. Індивідуальні особливості кнурів чинили вірогідний вплив на всі кінематичні параметри за винятком STR і LIN.



Таблиця 2

Кінематичні показники спермій після деконсервації та через 2 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M±m)

	Кінематичні характеристики								
	Активність,	ППР, %	VAP, мкм/с	VSL, мкм/с	VCL, мкм/с	ALH, мкм	BCF	STR, %	LIN, %
0 год									
Азотна ванна	49,8± 4,6	41,3± 5,1	116,9± 2,9*	109,5± 2,8*	154,7± 3,3*	5,3± 0,2	26,9± 0,8	91,5± 0,5	71,0± 1,3
Програмний заморозувач	64,8± 3,4*	51,1± 3,2	103,1± 3,7	94,9± 3,6	136,7± 4,9	5,0± 0,2	25,6± 0,6	90,5± 0,8	70,1± 1,6
2 год									
Азотна ванна	30,3± 5,7	16,7± 3,9	105,8± 6,3*	86,0± 5,7*	185,1± 8,6*	8,3± 0,3	22,4± 1,0	80,2± 1,0	48,3± 1,5
Програмний заморозувач	36,3± 4,8	19,9± 3,3	92,3± 5,1	75,4± 4,3	157,0± 8,2	7,4± 0,3	23,4± 1,2	81,2± 0,7	50,6± 1,3

Примітка. * — $p < 0,05$, вірогідна різниця.

Кількість спермій з неушкодженою плазматичною мембраною у процесі інкубації вірогідно знизилась при використанні двох досліджуваних способів заморожування сперми, проте збереженість плазматичних мембран була вірогідно вищою у зразках, заморожених на програмному заморозувачі ($p < 0,05$; табл. 3).

Таблиця 3

Цілісність плазматичних мембран спермій після деконсервації та через 2 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M±m

Методи заморожування	Збереженість плазматичних мембран, %
Азотна ванна	46,5 ± 4,0
Програмний заморозувач	61,7 ± 2,8*

Примітка. * — $p < 0,05$, вірогідна різниця.

При застосуванні однакового середовища і протоколу кріоконсервації сперми, повільна швидкість заморожування негативно вплинула на активність спермій у порівнянні із вищою швидкістю [12,13,14]. Однак, повільна швидкість заморожування спермій забезпечує вищу кількість спермій з неушкодженою плазматичною мембраною. В експериментах, проведених іншими дослідниками [15,16], за швидкого заморожування активність спермій не була вищою одразу після розморожування, але залишалась вищою протягом тривалішого часу при температурі інкубації 38 °С. У нашому дослідженні повільна швидкість заморожування показала свої переваги у порівнянні до швидкого як за активністю спермій, так і за цілісністю плазматичних мембран. Однак, швидкість спермій (VAP, VSL, VCL) і латеральне зміщення головки (ALH) було вищим у зразках сперми, заморожених з вищими швидкостями. Як ці параметри можуть вплинути на запліднюючу здатність спермій кнурів потрібно вивчати додатково.

Висновки. Застосування програмного заморозувача для кріоконсервації сперми кнурів забезпечує вищу активність спермій упродовж 8-годинного інку-



бування після розморожування (4,6-9,1 %) порівняно з використанням азотної ванни. При повільному заморожуванні сперми кнурів (використання програмного заморожувача) активність деконсервованих сперміїв зросла на 14,6 % ($p < 0,05$), кількість сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом на 9,7 %, збереженість плазматичних мембран – на 13,3 % ($p < 0,05$), порівняно із використанням азотної ванни. Швидке заморожування сперми кнурів призводить до вірогідного зростання кінематичних показників сперміїв (VAP, VSL, VCL) після деконсервації.

Бібліографічний список

1. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев. — 1991. — С.198.
2. Ескин Г. В. Теория и практика искусственного осеменения свиней свежезятой и замороженной спермой / Г. В. Ескин, А. Г.Нарижный, Г. С. Походня // Монография — 2007. — Белгород. Везелица. — С. 253.
3. Fiser P. S. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level / P. S. Fiser, R. W Fairfull, C. Hansen, P. L Panich, J. N. Shrestha, L. Underhill // Mol. Reprod. Dev. —1993. — V. 34 — P.190–5.
4. Hess E. A. Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedure / E. A. Hess, T. M. Ludwick, H. S.Teague // J. Anim. Sci. — 1960— V. 19. — P. 926–31.
5. Hernandez M. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability / M. Hernandez, J. Roca, M. A. Gil, J. M. Vazquez, E. A. Martinez // Theriogenology — 2007. — V.67:14 — P. 36–45.
6. Medrano A. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation / A. Medrano // Ph.D. Thesis, University of London, UK. — 1998.
7. Thurston L. M. An investigation into sources of variation and the genetic basis of boar spermatozoa survival following cryopreservation / L. M. Thurston // Ph.D. Thesis. University of London, London, UK; — 2000.
8. Roca J. Factors influencing boar sperm cryosurvival / M. Hernandez, G. Carvajal, J. M. Vazquez, E. A., Martinez // J. Anim. Sci. — 2006 — V. 84. — P. 2692–9.
9. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; // за ред. В. В. Влізла. — Львів: СПОЛОМ, 2012. — С. 539-540.
10. Holt C. Choice of operating conditions to minimise sperm sub-population sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis / C. Holt, W. Holt, V. Moor // J. Andro l. — 1996. — V. 17. — P. 587–95.
11. Jiang Z. Cryobiology / Z. Jiang, et al. // Cryobiology. 2007. — V. 54 — P. 301–304.
12. Woelders H. Boar variation in “freezability” of the semen / H.Woelders, A. Matthijs, M. Den Beston // Reprod. Domest. Anim. — 1996. —V.31.— P.153–9.
13. Pribenszky C. Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa / C. Pribenszky, M. Molnar, A. Horvath, A. Harnos, O. Szenci // Reprod. Fertil. Dev. — 2006. — V.18. — P.162–163.
14. Parks J. E. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes / J. E. Parks, J. K. Graham // Theriogenology —1992. — V.38. — P.209–222.
15. Hofmo P. O. Development and commercial use of frozen boar semen in Norway. / P. O. Hofmo, I. S. Grevle // In: Boar Semen Preservation IV. — 2000. —



P. 71–7.

16. Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends / M. Yoshida // Anim. Reprod. Sci. — 2000. V.60-61. — P.349–55.

КАЧЕСТВО ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ХРЯКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ЕЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Корбецкая О.О., Институт биологии животных НАА, г. Львов.

Приведены результаты изучения влияния замораживания в программном замораживателе и в азотной ванне на качество деконсервированной спермы хряков. Установлено, что криоконсервация спермы хряков в программном замораживателе обеспечила высшую активность спермиев и целостность плазматических мембран по сравнению с азотной ванной. Однако, отдельные кинематические показатели спермиев (VAP, VSL и VSL) были ниже, при быстром замораживании в азотной ванне.

Ключевые слова: сперма, хряк, замораживания, программный замораживатель, азотная ванна, деконсервация.

THE QUALITY OF THAWED BOAR SEMEN DEPENDING ON CRYOPRESERVATION METHOD

Korbetska O., Institute of Animal Biology NAAS

The study results of the influence of different methods of cryopreservation (program cell freezer and LN bath) on boar sperm quality after thawing have been shown. Found that boar semen cryopreservation in the program freezer provided higher progressive motility and plasma membrane integrity than LN bath. However, some sperm kinematic parameters (VAP, VSL and VSL) were lower with rapid freezing in a liquid nitrogen bath.

Keywords: sperm, boar, cryopreservation, program freezer, nitrig bath, thawing.

УДК 636.7:612.616;57.086.13; 547.458

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ МЕМБРАН І АКРОСОМ СПЕРМІЇВ СОБАК У ПРОЦЕСІ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ПРИ РІЗНИХ ЦУКРАХ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩА

Корбецький А.Р., пров. фах.

Інститут біології тварин НААН, м. Львів

У статті наведено результати вивчення впливу моно-, ди- та трисахаридів у складі середовища для криоконсервації сперми собак на активність спермій, цілісність їх плазматичних і акросомальних мембран. Встановлено, що найвищі показники активності спермій після деконсервації були отримані при додаванні до середовища фруктози, ксилози і трегалози. Найбільше зниження активності спермій після розморожування встановлено при додаванні до середовища для криоконсервації таких цукрів, як сахароза (38,6 %) і глюкоза (47,9 %). При використанні дослідних зразків середовищ для заморожування сперми собак, у склад яких входила фруктоза, ксилоза і трегалоза, спостерігали вищий рівень активності спермій після розморожування, менший відсоток спермій з ушкодженою плазматичною мембраною, порівняно з іншими дослідними групами, що свідчить про кращу мембранопротекторну дію даних середовищ.