було застосовано натурну модель капіляру сортера. На цій натурній моделі було випробувано сперму бугая та барана в умовах гідродинамічного стресу.

При підготовці сперми до сексингу для економії локомоторного ресурсу клітин було запропоновано спосіб скорочення часу фарбування сперматозоїдів. Сонікація клітин ультразвуком з 0,5 % ДМСО при 40 ºС скоротила фарбування до 10 хвилин.

Ключові слова: сексинг сперми, гідродинамічний стрес, розбавник сперми, сортер MoFlo-SX, проточна цитометрія.

FACTORS AFFECTING ON SEXING SPERM QUALITY

O.A. Chernetsov., B.M. Pavlenko, Institute of Animal Breeding of UAAS

The article is devoted to our teacher and head Feodor Ivanovich Ostashko.

In the process of separation on X-, Y- sperms cells the diluted sperms MoFlo-SX flow sorter passes a pressure gradient at about 3.5 atm., that causes hydrodynamic stress for cell. For sperm analysis in the pressure gradient state natural model of the capillary sorter was used. On this natural model bull and ram sperm was tested in conditions of hydrodynamic stress.

During preparation of sperm for a sexing the method of time reduction for sperm cells coloring was proposed for the economy of cell locomotion resource. Sonication of cells by ultrasound with 0.5 % of DMSO at 40 ºC reduced coloring time up to 10 minutes.

Keywords: a sperm sexing, hydrodynamic stress, a sperm extender, MoFlo SX sorter, flow sorter.

УДК 636.4:591.463.1; 638.124.4; 638.135

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА ДІЯ ПРОПОЛІСУ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ РОЗБАВЛЕННЯ І ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ КНУРІВ

Шаран М. М., д. с.-г. н., Горчин С. В., асп.
Інститут біології тварин НААН

Наведено результати вивчення антибактеріальних властивостей водного екстракту прополісу у складі середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів. Встановлено, що додавання до розріджувача для сперми кнурів «Екосперм» водної витяжки прополісу у концентрації 1,5 % замість антибіотиків забезпечило високу активність спермiїв до 5-ої доби зберігання (понад 50 %). Це підтверджується збільшенням показника абсолютного виживання на 9,4 %, виживаності спермiїв — на 11,2 %, порівняно з використанням антибактеріальних препаратів, та незначним зниженням pH впродовж інкубування in vitro.

Ключові слова: **сперма, кнур, прополіс, активність, показник абсолютного виживання, виживаність спермiїв.**

В останні роки великий інтерес із огляду на користь для здоров'я і безпеку застосування приділяють поліфенольним сполукам – флавоноїдам, які є кінцевим продуктами метаболічних перетворень амінокислот і ліпідів [1]. Основою молекулярної структури флавоноїдів є два бензольні кільця, з'єднані гетероциклічними кільцями пірану або пірону. Сила антиоксидантної активності флавоноїдів зале-

жить від кількості і положення гідроксильних груп. Чим більше гідроксильних груп, тим сильніша дія флавоноїдів [2].

Флавоноїди мають сильні антибактеріальні, протизапальні і протиракові властивості. Їх можна вважати потенційними імуностимулюючими речовинами, оскільки при низьких концентраціях стимулюють проліферацію і активність лімфоцитів [3]. Також їх дія не обмежується позаклітинною взаємодією, але й внутрішньоклітинною. Як показують дослідження Ansorge S. і співавт. (2003) [4] і Middleton Jr. E. та інші (2000) [3], флавоноїди можуть вплинути на експресію генів і активність ферментів.

Джерелом флавоноїдів в основному є фрукти, овочі, насіння, лікарські рослини, спеції, оливкова олія, чай, червоне вино, а також продукти бджільництва, такі як прополіс і бджолиний пилок. До складу прополісу, який можуть бути дуже різноманітним, оскільки залежить від складу рослин, з яких він був зібраний, входять смолянисті речовини, віск, леткі речовини, пилок і механічні добавки.

Антибактеріальні, протигрибкові і протипротозойні властивості прополісу є результатом дії флавоноїдів, ароматичних кислот та сесквітерпенів [5]. Етаноловий екстракт прополісу має антибактеріальну активність проти золотистого стафілокока, стрептокока, коринебактерій, двосторонньої пневмонії, туберкульозу, аеробних і анаеробних бактерій [6, 7]. У дослідженнях Yaghoubi S.M.J і співавт. (2007), крім антибактеріальних властивостей флавоноїдів (з вмістом 7,3 і 36 % в розчині) за дії на штами грампозитивних бактерій, показано сильний вплив на гриби [7].

Відомо, що водні екстракти прополісу мають ширший спектр дії, ніж спиртові. Причому водний екстракт має сильніший бальзамічний запах прополісу.

Застосовують водний екстракт прополісу як протибактерійний, противірусний та протигрибковий засіб. Літературні джерела вказують на позитивний вплив водного екстракту прополісу, введеного per os, на загальний стан організму кнурів і, як наслідок, на якість спермопродукції [8, 9].

Тому метою наших досліджень було вивчити антибактеріальну дію водного екстракту прополісу у складі середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проведено у Львівському НВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення Інституту біології тварин НААН. Об'єктом досліджень була сперма кнурів породи дюрок (n=3). Сперму відбирали мануально на чучело з режимом використання 2 рази на тиждень. В експерименті використали 12 еякулятів.

Після отримання визначали об'єм, концентрацію сперміїв в еякуляті, далі сперму транспортували у клімабоксі при температурі 17 ºС. З кожного еякуляту було сформовано 7 груп. Сперму всіх груп розріджували середовищем «Екосперм» [10] без антибіотиків із додаванням прополісу у різних концентраціях: 1 дослідна — 0,3 %, 2 дослідна — 0,6 %, 3 дослідна — 1,0 %, 4 дослідна — 1,5 %, 5 дослідна — 2,5 %, 6 дослідна — 3,5 %. У контрольній пробі використовували антибіотики бензилпеніцилін — 50 мг, ампіцилін — 25 мг на 100 мл середовища. В експерименті застосовували гомеопатичний препарат прополісу на шунтованій, іонізованій сріблом воді виробництва громади «Медвяна роса» (Львів).

Після розрідження сперму кнурів інкубували in vitro при температурі 17–18 °С впродовж 7 діб. Щоденно визначали активність і виживаність сперміїв. Активність сперми визначали при температурі 40 ºС за допомогою інвертованого мікроскопа Біолам П-1 («Ломо» , Росія) при збільшені х 150 у кількох полях зору в 2-3 краплях сперми, які наносили на предметне скельце.

Також визначали показник абсолютного виживання сперми за спрощеною формулою: $Sa = a^1/2 + \sum (a \times t) \times n$, де

Sa – показник абсолютної виживаності; ∑ – сума; а – оцінка сперміїв за рухливістю у балах; t – показник проміжку часу між попередньою і наступною перевіркою сперми; n – кількість проведених досліджень.

Впродовж інкубування визначали водневий показник (pH) сперми з використанням pH-метра 340 [11].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програми Statistica 7 (StatSoft, США).

Результати досліджень. Аналізом активності сперміїв кнурів встановлено суттєві зміни її впродовж інкубування in vitro, при цьому спостерігали відмінності між пробами сперми. Так, найбільше зниження активності сперміїв (12,8-15,0 %) впродовж інкубування спостерігали у 1-ій дослідній пробі з найменшою концентрацією прополісу до четвертої доби і 14,0-16,4 % — до шостої доби (табл. 1). З четвертої доби інкубування активність сперміїв була меншою за 50,0 %, що робить сперму непридатною до подальшого використання.

Станом на четверту добу інкубування активність сперміїв решти проб сперми кнурів перевищувала 50,0 %, що вказує на її придатність для штучного осіменіння свиноматок. Але між пробами була значна різниця. У 2, 5, 6-ій дослідних і контрольній пробах активність сперміїв була приблизно на однаковому рівні і становила 60,0-67,7 %, причому добове зниження активності сперміїв у цих групах коливалася в межах 5,2-15,8 %.

У 3 і 4-ій дослідних пробах добове зниження активності сперміїв було мінімальним — 4,8-9,8 %, що забезпечило найвищу активність (75,0-75,4 %) на четверту добу інкубування сперми. У цих же групах збереглася висока активність сперміїв і на п’яту добу інкубування — 53,5-55,0 %.

Таблиця 1

Активність сперміїв кнурів за інкубування при +17°С, %, n=12

Проби сперми	Доба інкубування сперми in vitro							P
	1	2	3	4	5	6	7	
1 Д	95,0	80,0	65,3	52,5	38,5	22,1	пооД.	<0,01
2 Д	95,0	85,0	78,1	63,2	43,2	25,0	10,0	<0,05
3 Д	95,0	88,2	82,4	75,0	53,5	30,6	15,0	<0,01
4 Д	95,0	90,0	85,2	75,4	55,0	32,0	15,0	<0,01
5 Д	95,0	85,2	80,0	65,0	44,5	26,5	10,0	<0,05
6 Д	95,0	85,2	75,8	60,0	40,0	25,0	10,0	<0,05
К	95,0	87,5	80,7	67,7	45,8	28,5	15,0	<0,05

Із шостої доби інкубування різко знижується активність сперміїв у всіх пробах сперми, що робить її непридатною для подальшого використання у відтворенні свиней.

Наступним етапом досліджень було визначення оптимальної дози водного екстракту прополісу за показником абсолютного виживання та виживаністю спе-

рміїв кнурів. Встановлено, що показник абсолютного виживання сперміїв кнурів у 1, 2, 5 і 6-ій дослідних пробах був нижчим, від контролю, відповідно, на 10,4 ($p<0,05$), 5,9, 3,4 та 8,1 % (табл. 2).

Таблиця 2

Показник абсолютного виживання (S) та виживаність сперміїв кнурів залежно від дози прополісу, n=12

Проби сперми	S	S, % до контролю	Виживаність, год	Виживаність,% до контролю
1 Д	905±32,3 *	89,6	192±8,5	89,3
2 Д	950±26,2	94,1	198±10,2	92,1
3 Д	1080±31,5	106,9	235±12,4	109,3
4 Д	1105±30,1 *	109,4	239±10,5	111,2
5 Д	976±25,4	96,6	206±13,5	95,8
6 Д	928±23,2 *	91,9	196±11,3	91,2
К	1010±33,4	100,0	215±11,7	100,0

*Примітка. * — $p<0,05$, вірогідна різниця між контрольною і дослідними пробами.*

У 1 і 6-ій дослідних пробах сперми виживаність сперміїв теж була, відповідно, на 10,7 та 8,8 % меншою порівняно з контрольною пробою. У 2 та 5-ій дослідних пробах виживаність сперміїв кнурів теж була меншою від контролю, проте різниця була невірогідною і становила, відповідно, 7,9 та 4,2 %.

Найвищі результати отримали у 3 і 4-ій дослідних пробах, де показник абсолютного виживання сперміїв кнурів, відповідно, на 6,9 і 9,4 % ($p<0,05$) вищий, ніж у контрольній пробі сперми. Виживаність у вказаних пробах сперми також була, відповідно, на 9,3, 11,2 % більшою, порівняно з контрольними зразками.

Аналізуючи pH сперми кнурів впродовж інкубування in vitro, слід відзначити певні закономірності. Щодоби pH у всіх пробах сперми незначно зменшувалося, проте високий ступінь вірогідності у певні дні та за різних концентрацій водного екстракту прополісу у складі середовища свідчать про вплив прополісу на запліднюючу здатність сперміїв. Зокрема, pH сперми кнурів 1 і 6-ої дослідних та контрольної проб вірогідно знижувалося ($p<0,01$-$0,001$) з третьої до шостої доби культивування. Аналогічно рівень pH у 2, 5 і 6-ій дослідних пробах вірогідно знижувався ($p<0,05$-$0,001$) з третьої доби, проте ступінь вірогідності у вказаних зразках був найнижчим ($p<0,05$) на третю добу (табл. 3).

Вірогідне зниження водневого показника сперми кнурів 3 і 4-ої дослідних і контрольної проб починалося лише з п'ятої доби, що вказує на інгібування метаболічних процесів у сперміях і продовження їх життєдіяльності, однак ступінь вірогідності був найнижчим у 4-ій дослідній пробі.

Отже, найменше зниження pH сперми кнурів було у 4-ій дослідній пробі з концентрацією водної витяжки прополісу 1,5 %, де й активність сперміїв впродовж інкубування була найвищою.

Таким чином, застосування водного екстракту прополісу у складі розріджувача для сперми кнурів «Екосперм» проявляє найбільшу антибактеріальну дію у концентрації 1,5 %, забезпечуючи високу активність сперміїв (понад 50 %) до п'ятої доби зберігання. Високі антимікробні властивості препарату пролісу зумовлені комплексною дією флавоноїдів, ароматичних кислот та сесквітерпенів, а також шунгованої води, іонізованої сріблом. Відомо, що мінерал шунгіт володіє

унікальною здатністю надавати пропущеній через нього рідині цілющі властивості. Вода, пропущена через шунгіт, змінює свою структуру і набуває якості «живої води». Ці комплексні властивості компонентів препарату забезпечують тривале збереження активності сперміїв, більшу їх виживаність та сповільнення окисних процесів у середовищі для розбавлення і зберігання сперми кнурів.

Таблиця 3

pH сперми кнурів впродовж інкубування in vitro, n=12

Проби сперми	Доба інкубування сперми in vitro						
	1	2	3	4	5	6	7
1 Д	7,2± 0,06	7,0± 0,07	6,7± 0,04**	6,3± 0,07***	5,8± 0,06***	5,3± 0,07***	-
2 Д	7,2± 0,07	7,1± 0,06	6,9± 0,05*	6,5± 0,06***	6,1± 0,05***	5,6± 0,08***	5,3± 0,05**
3 Д	7,2± 0,07	7,1± 0,08	7,0± 0,06	6,8± 0,07	6,5± 0,06***	6,2± 0,05***	5,8± 0,06***
4 Д	7,2± 0,06	7,1± 0,07	7,0± 0,07	6,8± 0,07	6,6± 0,05*	6,3± 0,07**	5,9± 0,05***
5 Д	7,1± 0,08	7,0± 0,06	6,8± 0,06*	6,5± 0,07**	6,1± 0,06***	5,7± 0,07***	5,4± 0,06**
6 Д	7,2± 0,07	7,0± 0,05	6,8± 0,05*	6,3± 0,08***	5,9± 0,05***	5,5± 0,07***	5,3± 0,05*
К	7,2± 0,06	7,1± 0,07	7,0± 0,06	6,8± 0,07	6,5± 0,06**	6,2± 0,07**	5,8± 0,06***

*Примітка. * — p<0,05, ** — p<0,01, *** — p<0,001, вірогідна різниця між кожною попередньою і наступними добами по пробах.*

Висновки. Використання водного екстракту прополісу у складі середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів у концентраціях 1,0 та 1,5 % проявляє антибактеріальну дію, аналогічну антибіотикам. Водна витяжка прополісу у 1,5 %-ій концентрації у складі розріджувача сперми замість антибіотиків забезпечує високу активність сперміїв кнурів до 5-ої доби зберігання (понад 50 %). Висока антибактеріальна ефективність 1,5 %-го екстракту прополісу підтверджується більшим показником абсолютного виживання на 9,4 % та виживаності сперміїв кнура на 11,2 %, порівняно з контролем, а також мінімальним щодобовим зниженням водневого показника.

Бібліографічний список

1. Sosin-Bzducha E. Propolis źródłem flawonoidów korzystnych dla zdrowia i produkcyjności bydła / E. Sosin-Bzducha, J. Strzetelski // Wiadomości Zootechniczne, R. L. — 2012. — N 2. — S. 23–28.

2. Rice-Evans C.A. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids / C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga // Free Radic. Biol. Med. — 1996. — V. 20. — P. 933.

3. Middleton Jr. E. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer / Jr. E. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides // Pharmacol. Rev. — 2000. — V. 52. — P. 673−751.

4. Ansorge S. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine but induce TGF-β1 produktion of human immune

cells / S. Ansorge, D. Reinhold, U. Lendeckel // Z. Naturforsch — 2003. — V 58 c. — P. 580−589.

5. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease / M. Lotfy // Asian Pacific J. Cancer Prev. — 2006. — V. 7. — P. 22−31.

6. Dobrowolski J.W. Antibacterial, antifungal antiameobic, anitinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products / J. W. Dobrowolski, S. B. Vohora, K. Sharma, S. A. Shah, S. A. Naqvi, P. C. Dandiya // J. Ethnopharmacol., 1990. — V. 35. — P. 77−82.

7. Yaghoubi S.M.J. Growth, weanning performance and blood indicators of humoral immunity in Holstein calves fed suplemental flavonoids // S. M. J.Yaghoubi, G. R. Ghorbani, H. R. Rahmani, A. Nikkhah // (J. Anim. Phys. Anim. Nutr. — 2007 b. — P. 369−439.

8. Барсков А.А. Технология лекарственных форм из прополиса для ветеринарии / А. А. Барсков // Практик — 2003. — № 7-8. — С. 56-60.

9. Гизатуллин Т. Р. Молекулярные маркеры фертильности и состояние свободнорадикального окисления у сотрудников спецподразделений МВД в условиях боевого стресса: дис. … канд. мед. наук: 14.03.03 / Гизатуллин Тагир Рафаилович. — Нижний Новгород, 2010. — 133 с.

10. Пат. 29220 Україна МПК A61D19/02 (2007.01). Середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» / А. Р. Корбецький, М. М. Шаран, С. Б. Корнят і ін.; заявник і патентовласник Ін-т біології тварин НААН. — u 2007 08849 від 31.07.2007; опубл. 10.01.2008. Бюл. №1.

11. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. — Львів: СПОЛОМ, 2012. — С. 539-540.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОПОЛИСА В СОСТАВЕ СРЕДЫ ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

Шаран Н.М., Горчин С.В.Институт биологии животных НААН

Представлены результаты изучения антибактериальных свойств водного экстракта прополиса в составе среды для разбавления и хранения спермы хряков. Установлено, что добавление к разбавителю для спермы хряков «Экосперм» водной вытяжки прополиса в концентрации 1,5 % вместо антибиотиков обеспечило высокую активность спермиев до 5-х суток хранения (более 50 %). Это подтверждается увеличением показателя абсолютного выживания на 9,4 %, выживаемости спермиев — на 11,2 %, по сравнению с использованием антибактериальных препаратов, и незначительным снижением pH в течение инкубации in vitro.

Ключевые слова: сперма, хряк, прополис, активность, показатель абсолютного выживания, выживаемость спермиев.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PROPOLIS CONTAINED IN THE MEDIUM FOR DILUTION AND STORAGE OF PIGS SPERM

N.M.Sharan, S.V.Horchyn, Institute of Animal Biology UAAS

The article presents the results by studying the antibacterial properties of the aqueous extract of propolis, contained in the medium for dilution and storage of boars' sperm. The study defined that the addition of the Ecosperm propolis aqueous extract in 1.5 % concentration instead of antibiotics into diluents of boar sperm provided high sperm activity by 5 days of storage (more than 50%). This is confirmed by an increase of the absolute survival rate and survival of sperm by 9.4 % and 11.2 % accordingly, compared with the use of antibacterial drugs, and by insignificant decrease in pH during incubation in vitro.

Keywords: sperm, boar, propolis, activity, absolute survival rate, survival of sperm.