

ВПЛИВ ДОДАВАННЯ РІЗНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛІЦЕРИНУ ДО СЕРЕДОВИЩА НА ЯКІСТЬ СПЕРМІЇВ КНУРІВ ПЕРЕД ЗАМОРОЖУВАННЯМ

О. О. Корбецька, А. Р. Корбецький, М. М. Шаран

Інститут біології тварин НААН

У статті наведено результати вивчення впливу додавання різної концентрації гліцерину до середовища та тривалості еквілібрування на якість сперміїв кнурів перед заморожуванням. Оцінювання сперми проводили за наступними показниками: активність, цілісність і функціональність плазматичних мембран та збереженість акросом сперміїв. Встановлено, що підвищення концентрації гліцерину (6 %) за зменшеної експозиції (1 хв.) не спричиняють негативного впливу на якість сперміїв – активність, цілісність і функціональність плазматичних мембран та збереженість акросом, які ідентичні контролю. Використання зменшеної концентрації гліцерину (2 %) за малої тривалості інкубування (1 і 15 хв.) не призводять до суттєвих змін показників якості сперміїв перед заморожуванням. Висока концентрація гліцерину (8, 10 %) за різної тривалості інкубування вірогідно знижує якісні показники сперміїв.

При криоконсервуванні сперми кнурів, як криопротектор використовують гліцерин, який проникаючи крізь плазматичну мембрану зв'язує воду, стабілізуючи просторове розташування молекул води самої клітини. Гліцерин сприяє переохолодженню і дрібнокристалічному замерзанню середовища, а також склоподібному замерзанню сперміїв, діє як «сольовий буфер», розчиняє надлишок солей, підтримує їх концентрацію під час заморожування і розморожування нижче від критичних температур [1, 2]. Ступінь негативного впливу гліцерину на сперму кнурів залежить від його концентрації, експозиції, часу і температури, що зв'язано зі зміною осмотичного тиску при заморожуванні і розморожуванні [3]. Оскільки гліцерин порушує клітинний метаболізм, спермії заморожують у середовищі з його концентрацією 2–3 % [4]. У процесі охолодження зростає в'язкість гліцерину, що призводить до уповільнення росту кристалів і швидкості дегідратації [4, 5]. Концентрація гліцерину, яка зберігає активність і цілісність акросом сперміїв кнурів нижча, ніж для інших видів тварин [6]. Однак, механізми дії криопротекторів як і інших компонентів до кінця не в'яснено.

Метою досліджень було вивчення впливу різної концентрації гліцерину та тривалості еквілібрування на морфо-біохімічні показники якості сперміїв кнурів перед заморожуванням.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Сперму для досліджень відбирали раз на тиждень мануальним методом від 6 кнурів віком два – п'ять років, живою масою 200–340 кг, порід — велика біла (2), п'єтрен (1), ландрас (2), гемпшир (1) у Львівському науково-виробничому центрі (ЛНВЦ) «Західплемресурси».

Концентрація гліцерину в середовищі контрольної групи становила 4 %. Дослідні групи відрізнялись між собою концентрацією гліцерину: 1-ша група — без гліцерину, 2-га група — 2 %, 3-тя група — 6 %, 4-та група — 8 %, 5-та група — 10 %. Контрольною тривалістю еквілібрування сперми з гліцерином було 15 хв., дослідними: 1, 30 та 60 хв.

Для криоконсервування сперми кнурів використовували середовище, розроблене у Всеросійському Інституті тваринництва [7]. Перед заморожуванням визначали активність сперміїв, цілісність і функціональність плазматичних мембран та збереженість акросом.

Активність сперміїв визначали методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 за збільшення $\times 400$ та виражали у відсотках сперміїв з прямолінійно-

поступальним рухом від загальної кількості [8]. Цілісність плазматичних мембран (ЦПМ) визначали за зростанням активності маркерного ензиму лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) в екстрацелюлярному середовищі (плазмі/середовищі) кінетичним методом за допомогою набору Liquick Cog-LDH® [9]. Функціональність плазматичних мембран спермій оцінювали за допомогою тесту гіпоосмотичного набрякання спермій (ТГНС) [10]. Збереженість акросом (ЗА) спермій визначали за зростанням активності маркерного ферменту акрозину (КФ 3.4.21.10) у середовищі при збільшенні кількості спермій з ушкодженими акросомами [11]. Статистичний аналіз результатів дослідження здійснювали за допомогою пакета прикладного програмного забезпечення Statistica 8.0 (Statsoft, США).

Результати й обговорення. Встановлено, що концентрація гліцерину та тривалість його контакту із сперміями у процесі еквілібрування перед заморожуванням по-різному впливають на якість спермій. Як видно з таблиці, середовище з концентрацією гліцерину 2 % за всіх досліджуваних періодів часу еквілібрації зі спермою (1, 15, 30 та 60 хв.) не забезпечило вірогідної різниці за всіма досліджуваними показниками якості сперми перед заморожуванням порівняно з контролем (4 % гліцерину в середовищі та 15 хв. еквілібрації).

Таблиця

Показники якості спермій кнурів перед заморожуванням за різної концентрації гліцерину у середовищі та тривалості еквілібрування, $M \pm m$, $n=18$

Концентрація гліцерину, %	Тривалість еквілібрування, хв.	Активність, %	ЦПМ, %	ТГНС, %	ЗА, %
без гліцерину		74,3±1,5	81,2±1,8	84,5±1,8	65,2±1,7
2	1	75,9±1,8	83,4±1,7	85,4±1,5	64,1±1,5
	15	73,4±1,7	79,6±2,1	87,1±2,1	63,7±1,3
	30	70,9±1,6	80,9±1,5	85,0±1,6	62,4±1,9
	60	69,1±1,9	82,7±1,3	86,7±1,9	64,7±1,5
4	1	73,4±2,2	84,1±1,6	85,2±1,7	63,5±1,1
	15(К)	74,9±2,3	83,6±1,7	86,1±1,4	65,2±2,1
	30	71,1±1,9	81,7±1,9	84,5±1,7	62,5±1,7
	60	66,9±2,5 ^{1a}	80,6±2,1	82,9±1,5	61,6±2,1
6	1	75,6±2,1	83,9±2,0	85,6±1,2	66,1±1,3
	15	73,2±2,2	81,3±1,8	83,1±1,6	64,7±1,6
	30	68,1±1,8 ¹	80,4±1,3	85,3±1,8	64,9±1,8
	60	62,3±2,4 ^{b3}	79,5±1,2	84,2±2,0	63,7±1,3
8	1	74,6±2,5	82,7±1,7	86,5±1,6	64,4±1,9
	15	70,2±1,8	81,8±1,6	84,9±1,5	62,9±1,3
	30	63,8±2,5 ^{a2}	79,7±1,5	84,4±1,4	60,3±1,7
	60	57,5±2,1 ^{c3}	77,4±1,9 ¹	83,4±1,9	59,4±1,6 ¹
10	1	72,1±2,0 ^a	80,5±1,4	84,4±1,7	64,7±1,8
	15	66,5±1,6 ²	79,8±1,6	86,9±2,1	62,4±1,6
	30	59,9±2,3 ^{a3}	76,7±1,5 ²	83,1±1,8	60,8±1,5
	60	43,8±2,5 ^{c3}	74,8±2,1 ²	80,3±1,9 ^{a1}	55,8±1,9 ^{2a}

Примітка: Різниця між даними, позначеними наступним знаком, є вірогідною порівняно з: 1) контролем:¹ – $p < 0,05$; ² – $p < 0,01$; ³ – $p < 0,001$; 2) даним показником за тривалості еквілібрації 15 хв. у середовищі з зазначеною концентрацією гліцерину: ^a – $p < 0,05$; ^b – $p < 0,01$; ^c – $p < 0,001$

Проте, активність спермій за концентрації гліцерину 2 % при еквілібрації 30 та 60 хв. була вірогідно ($p < 0,05$) нижчою порівняно з тривалістю еквілібрації протягом 1 хв за цієї ж концентрації гліцерину у середовищі. За показником цілісності плазматичних мембран за концентрації 2 % гліцерину в середовищі та всіх досліджуваних періодів часу еквілібрації не встановлено вірогідної різниці між ними. Підрахунок кількості спермій з функціональними

плазматичними мембранами за допомогою ТГНС теж не виявив вірогідних різниць між різною тривалістю еквілібрації за концентрацією гліцерину в середовищі 2 %. Дещо схожу ситуацію спостерігали за показником збереженості акросом спермій, де між всіма періодами часу еквілібрації не спостерігалось вірогідної різниці, що вказує на відсутність негативного впливу гліцерину в концентрації 2 % на показники цілісності та функціональності плазматичних мембран і акросом спермій за різної тривалості контакту гліцерину в середовищі.

За концентрації у середовищі гліцерину 4 % та тривалості еквілібрування протягом 60 хв активність спермій була нижчою ($p < 0,05$) на 10,7 % порівняно з контролем. Водночас не спостерігалось вірогідної різниці між активністю в зразках з еквілібрацією 1, 15, та 30 хв. у середовищі з 4 % гліцерину. Також, не встановлено вірогідних різниць між всіма досліджуваними еквілібраціями за кількістю спермій з неушкодженими мембранами. Схожу тенденцію спостерігали за кількістю спермій з функціональною плазматичною мембраною та з неушкодженою акросомою, де незважаючи на відсутність вірогідних різниць між різною тривалістю еквілібрації з гліцерином за цими показниками спостерігалось зниження якості спермій із зростанням часу контакту сперми з гліцерином відповідно — 82,9 та 61,6 % за еквілібрації 60 хв. Підвищення концентрації гліцерину в середовищі за тієї ж тривалості еквілібрації призводить до негативного впливу тривалого часу з гліцерином впродовж 30 та 60 хв. Так, еквілібрація зразків сперми протягом 30 хв з гліцерином у концентрації 6 % в середовищі призвела до зниження активності спермій на 9,1 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Подальше зростання тривалості еквілібрації гліцерину із сперміями призвело до ще більшого зниження активності спермій — на 16,8 % ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Також, за концентрації гліцерину 6 % активність спермій за тривалості еквілібрації 60 хв була нижчою на 14,9 % ($p < 0,01$) порівняно з тривалістю еквілібрації 15 хв. Кількість спермій з неушкодженими плазматичними мембранами не відрізнялись вірогідно між зразками за різної тривалості еквілібрації при концентрації гліцерину 6 %. Подібна тенденція спостерігалась за функціональністю плазматичних мембран та кількістю спермій з неушкодженою акросомою. Застосування гліцерину в концентрації 8 % у середовищі призвело до зниження активності спермій за еквілібрації 30 хв на 14,8 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем і на 6,3 % ($p < 0,05$) порівняно з тривалістю еквілібрування 15 хв за тієї ж концентрації гліцерину. Ще більший негативний вплив концентрації гліцерину 8 % у середовищі спостерігався за збільшеної тривалості еквілібрування до 60 хв, де активність спермій була нижчою на 16,8 % ($p < 0,001$) порівняно з контролем та на 18,1 % порівняно з еквілібрацією протягом 15 хв за цієї ж концентрації гліцерину в середовищі. Аналогічно тривалість еквілібрації протягом 60 хв та концентрація гліцерину в середовищі 8 % призвела до зниження кількості спермій із неушкодженою плазматичною мембраною на 7,4 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем, тоді як менша тривалість (1, 15 та 30 хв) контакту спермій із середовищем вірогідно не відрізнялись як від контролю так і між собою, хоча спостерігалась тенденція до зниження цього показника зі зростанням часу еквілібрації з гліцерином. На відміну від показника цілісності плазматичних мембран нами не встановлено вірогідної різниці між показником функціональності мембран спермій за різної тривалості еквілібрації та концентрації гліцерину 8 % у середовищі перед заморожуванням, між собою та порівняно з контролем. У свою чергу, кількість спермій з неушкодженою акросомою була нижчою на 8,9 % ($p < 0,05$) за еквілібрації протягом 60 хв. і цієї ж концентрації гліцерину в середовищі порівняно з контролем. Кількість спермій з неушкодженою акросомою за еквілібрації сперми з гліцерином впродовж 1, 15 та 30 хв. вірогідно не відрізнялися між собою та контролем і становили 59,4–64,4 %.

Подальше збільшення концентрації гліцерину до максимального значення 10 % за тих же періодів часу еквілібрування призвело до зниження активності спермій у групі з еквілібрацією протягом 15 хв. на 11,2 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем. Збільшення

тривалості контакту сперміїв з гліцерином до 30 та 60 хв призвело до зниження активності сперміїв — відповідно, на 20,0 та 41,5 % ($p < 0,001$). У той же час активність сперміїв у групі з тривалістю еквілібрації 1 хв. була вищою на 8,4 % ($p < 0,05$) порівняно з групою, яка пройшла еквілібрацію з гліцерином протягом 15 хв. за його концентрації у середовищі 10 %. Активність сперміїв у зразках, еквіліброваних впродовж 30 та 60 хв., була нижчою на 9,9 % ($p < 0,05$) та 34,1 % ($p < 0,001$), відповідно. Висока концентрація гліцерину також негативно вплинула на кількість сперміїв з неушкодженою плазматичною мембраною за винятком того, що цей показник був нижчий лише в зразках, тривалість еквілібрації з гліцерином в яких була 30 та 60 хв., відповідно, на 8,3 та 10,5 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем. Зразки сперми, в яких була проведена еквілібрація 1 та 15 хв., вірогідно не відрізнялись між собою порівняно з контролем. Показник функціональності плазматичних мембран за всіх попередньо досліджених концентрацій гліцерину (2, 4, 6 і 8 %) та тривалості еквілібрації вірогідно не відрізнявся від контролю та між групами. Однак, за концентрації гліцерину 10 % у середовищі та тривалості еквілібрації 60 хв спостерігали вірогідне зниження кількості сперміїв з функціональною плазматичною мембраною порівняно з контролем на 6,7 % ($p < 0,05$). Водночас за тривалості еквілібрації 1, 15, та 30 хв. із гліцерином вірогідної різниці між групами за цим показником не встановлено. Кількість сперміїв з неушкодженою акросомою була нижча на 14,4 % ($p < 0,01$) порівняно з контролем та на 10,6 % ($p < 0,05$) порівняно до групи, в якій еквілібрація проводилась протягом 15 хв.

ВИСНОВКИ

1. Застосування вищих концентрацій гліцерину (8, 10 %) за різної тривалості інкубування зумовило зниження всіх показників якості сперміїв.

2. За цілісністю плазматичних мембран та збереженістю акросом якості сперміїв була вірогідно ($p < 0,05-0,01$) нижчою, порівняно з контролем.

Перспективи подальших досліджень. На основі проведених експериментів перспективними будуть дослідження з вивчення взаємозв'язку між концентрацією гліцерину у середовищі для заморожування сперміїв кнурів на ефективність запліднення свиноматок.

EFFECT OF ADDITION OF DIFFERENT GLYCEROL CONCENTRATIONS TO EXTENDER ON QUALITY OF BOAR SPERMATOZOA BEFORE FREEZING

O. O. Korbetska, A. R. Korbetskyy, M. M. Sharan

Institute of Animal Biology of NAAS

SUMMARY

In this article are given the study results of influence of different glycerol concentrations addition to freezing extender and duration of equilibration on the quality of boar sperm before freezing. Evaluation of sperm quality was carried out by following indexes: activity, integrity and functionality of the plasma membrane and acrosome of sperm survival. Revealed, that increased glycerol concentrations (6 %) with reduced exposure (1 min) did not result in any negative impact on sperm quality — progressive motility, membrane functionality and sperm plasma membrane and acrosome integrity were identical to control. The use of reduced concentrations of glycerol (2 %) for short duration of incubation (1 and 15 min) did not lead to significant changes in indexes of sperm quality before freezing. The high concentration of glycerol (8, 10 %) for varying lengths of incubation significantly reduced sperm quality indexes.

ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИЦЕРИНА В СРЕДУ НА КАЧЕСТВО СПЕРМИЕВ ХРЯКОВ ПЕРЕД ЗАМОРАЖИВАНИЕМ

О. О. Корбецкая, А. Р. Корбецкий, Н. М. Шаран

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты изучения влияния добавления различной концентрации глицерина к среде и продолжительности эквilibрации на качество спермиев хряков перед замораживанием. Оценку спермы проводили по следующим показателям: активность, целостность, функциональность плазматических мембран и сохранность акросом спермиев. Установлено, что повышение концентрации глицерина (6 %) по уменьшенной экспозиции (1 мин.) не влекут негативного влияния на качество спермиев — активность, целостность и функциональность плазматических мембран и сохранность акросом идентичным контролем. Использование уменьшенной концентрации глицерина (2 %) малой длительности инкубирования (1 и 15 мин.) не приводят к существенным изменениям показателей качества спермиев перед замораживанием. Высокая концентрация глицерина (8, 10 %) при различной продолжительности инкубирования достоверно снижает качественные показатели спермиев.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Nauk V. A.* Structure and function sperm domestic animals at cryopreservation]. Kyshynev, 1991. — 198 p.
2. *Kurbatov A. D., Platov E. V., Korban N. V.* Semen cryopreservation of domestic animals. L.: Ahropromyzzdat, 1988. — 256 p.
3. *Polge C.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures / C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes // *Nature*. — 1949. — 164. — P. 666.
4. *Lovelock J. E.* The immobilization of spermatozoa by freezing and the protective action of glycerol / J. E. Lovelock, C. Polge // *Biochem. J.* — 1954. — Vol. 58. — P. 618–622.
5. *Berndtson W. E.* The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to glycerol or lactose / W. E. Berndtson and R. H. Foote // *Cryobiology*. — 1972b. — 9. — P. 57.
6. *Almilid T.* Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws / T. Almilid, L. A. Johnson // *J. Anim. Sci.* — 1988. — 66. — P. 2899–2905.
7. *Eskyn H. V., Naryzhnyi A. H., Pokhodnia H. S.* The theory and practice of artificial insemination of pigs fresh semen and frozen sperm. Monohrafia, 2007, Belhorod, Vezelytsa. P. 253.
8. *Корбецкий А. Р.* Морфологічна оцінка сперми методом фазово-контрасної мікроскопії / А. Р. Корбецкий // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин та ДНДКІ ветеринарних препаратів і кормових добавок. — Львів, 2006. — Вип. 7, № 3, 4. — С. 236–240.
9. *Kuznetsov A. V.* Laboratory Protocol Lactate Dehydrogenase / A. V. Kuznetsov, E. Gnaiger // *Cytosolic marker enzyme Mitochondrial Physiology Network*. — 2010. — V. 08.18. — P. 1–8.
10. *Vazquez J. M.* Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane / J. M. Vazquez, E. A. Martinez, P. Martinez et al. // *Theriogenology*. — 1997 Mar. — V. 47 (4). — P. 913–22.
11. *Lax Y.* Acrosin activity assay for the evaluation of mammalian sperm acrosome reaction / Y. Lax, S. Rubinstein, H. Breitbart // *Methods Mol. Biol.* — 2004. — 253. — P. 135–40