

## ВПЛИВ ДОДАВАННЯ “ЕССЕНЦІАЛЕ®” ТА БСА ДО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЯКІСТЬ СПЕРМІЇВ ПСІВ ПІСЛЯ РОЗМОРОЖУВАННЯ

А. Р. Корбецький, М. М. Шаран

Інститут біології тварин НААН

*У статті наведено результати досліджень з вивчення впливу різних концентрацій фосфатидилхоліну, що міститься у препараті “Ессенціале®” на плазматичні мембрани та акросоми спермій псів після розморожування, а також його комбіноване використання з бичачим сироватковим альбуміном. Додавання в середовище для кріоконсервування сперми псів фосфатидилхоліну в концентрації 20 мг/мл забезпечило показники активності спермій, цілісності і функціональності плазматичних мембран, збереженості акросом та виживаності після розморожування на рівні, що вірогідно не відрізнялось від зразків, що були заморожені у середовищі з цільним курячим жовтком. Комбіноване використання фосфатидилхоліну з БСА у концентрації 0,5 та 1 % забезпечило вірогідно вищу активність, на 7,3 % та 8,5 % відповідно ( $p < 0,05$ ), цілісність плазматичних мембран на 8,9 та 9,4 % ( $p < 0,05$ ), кількість спермій з неушкодженою акросомою на 7,3 % ( $p < 0,01$ ) та 5,2 ( $p < 0,05$ ) відповідно. Тоді як показник функціональності плазматичних мембран та виживаності спермій псів після розморожування була вірогідно вищою тільки при концентрації БСА 1% на 6,1 % та 26,23 %, відповідно, порівняно із середовищем, що містило тільки фосфатидилхолін у концентрації 20 мг/мл.*

Кріоконсервування спермій є важливим біотехнологічним методом для забезпечення генетичної різноманітності відтворення різних видів тварин. Штучне осіменіння сук заморожено-відталою спермою зараз пропонується як щоденний клінічний сервіс багатьма ветеринарами в Європі та США, однак, рівень результативних осіменінь є надзвичайно варіабельний і загалом нижчий від осіменіння свіжоотриманою спермою [1].

Багато факторів впливає на функціональне виживання замороженої сперми псів. Одним із найважливіших є здатність плазматичних мембран спермій протистояти змінам у клітині в процесі заморожування-розморожування [2, 3]. Зміни, які відбуваються в плазматичній мембрані спермій під час заморожування чинять негативний вплив, на функціональність цілої клітини, ушкодження плазматичної мембрани спричиняє суттєві фізіолого-біохімічні зміни, які призводять до загибелі спермій. Із огляду на це, до складу середовища вводяться мембранопротекторні компоненти, які взаємодіючи із плазматичною мембраною забезпечують її високу стійкість до заморожування [4, 5]. Зроблені також спроби замінити жовток курячого яйця у середовищах на фосфатидилхолін (лецитин), який уже використовується для кріоконсервування сперми баранів [6].

Метою нашої роботи було дослідження стану плазматичних і акросомальних мембран за використання різних мембраностабілізуючих та мембраномодифікуючих чинників, зокрема фосфатидилхоліну, що міститься в препараті “Ессенціале®” окремо та в комбінації з бичачим сироватковим альбуміном (БСА), для забезпечення підвищення якості спермій псів після розморожування та її запліднювальної здатності.

**Матеріали і методи.** Усі маніпуляції з тваринами проводили в дослідній клініці лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Для досліджень використовували дев'ять клінічно здорових статевозрілих псів віком два–п'ять років, різних порід та живою масою, а саме: тварини змішаної породи ( $n=2$ ), що утримували у

вольєрі Інституту біології тварин та тварини, що приводили власники для андрологічного обстеження та були систематично задіяні у дослідженнях, порід – доберман пінчер (1), англійський бульдог (3), німецька вівчарка (2), кавказька вівчарка (1). Сперму від псів відбирали за режимом два рази на тиждень. Перед взяттям сперми препуціальний отвір очищався ватними дисками змоченими фізіологічним розчином від залишків сечі та інших видимих забруднень. Відбір сперми проводився мануально, як було описано [1], в ПВХ рукавиці, методом мастурбації в попередньо підігріті до температури 37 °С стерильні лійки та градуйовані пластикові пробірки об'ємом 15 мл. Для досліджень використовували тільки другу фракцію еякуляту. Після взяття сперму переносили у водяний термостат (37 °С) для оцінки якості і подальших технологічних процедур.

До середовища додавали препарат “Ессенціале®” як джерело високоочищеного фосфатидилхоліну (лецитину), бичачий сироватковий альбумін (БСА) та їх комбінації. У першій частині досліду додавали 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 мл «Ессенціале»® або відповідно 10, 15, 20, 25 та 30 мг/мл фосфатидилхоліну. У другій частині досліду вивчали вплив комбінованого використання найбільш ефективної концентрації фосфатидилхоліну та БСА у концентрації 0,25, 0,5 і 1 %. Контролем у досліді слугувало середовище з використанням цільного жовтка та у частині досліду, де вивчали комбінований вплив лецитину та БСА — середовище без додавання БСА.

Сперму фасували в соломинки об'ємом 0,5 мл (IMV, Франція). Соломинки закладали у тримачі програмного заморожувача клітин Cell Freezer R 204 (Planer, Великобританія) і поміщали в камеру заморожувача з попередньо налаштованою стартовою температурою +5 °С. Заморожували за режимом: від +5 до – 10°С при 5 °С/хв, від – 10 до – 100°С при 30 °С/хв, від – 100 до – 130°С при 10 °С/хв. Соломинки зі спермою після завершення програми переносили з камери заморожувача в пінополістеролову ванну з рідким азотом (– 196 °С). Деконсервування спермійів проводили у водяному термостаті при 70 °С впродовж 8 с з подальшим перенесенням у водяний термостат з 37 °С.

Методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 за збільшення х 400 визначали активність спермійів псів та виражали у відсотках спермійів з прямолінійно-поступальним рухом від загальної кількості [4]. За зростанням активності маркерного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) в (плазмі/середовищі) визначали цілісність плазматичних мембран (ЦПМ) кінетичним методом за допомогою набору Liquick Cor-LDH® [7]. Функціональність плазматичних мембран спермійів оцінювали за допомогою тесту гіпоосмотичного набрякання спермійів (ТГНС) [8]. За зростанням активності маркерного ферменту акрозину (КФ 3.4.21.10) у середовищі визначали збереженість акросом (ЗА) спермійів [9]. Зростання активності акрозину в середовищі прямопропорційне ступеню ушкодження акросом. Збереженість акросом (ЗА) вираховували за формулою:

$$ЗА\% = 100 * \frac{АК_{\max} - АК_{зр}}{АК_{\max}}$$

де: АК<sub>макс</sub> – активність акрозину в середовищі при примусовому ушкодженні акросом у суспензії свіжоотриманих спермійів із концентрацією 100 x 10<sup>6</sup> спермійів/мл за допомогою Triton X-100, вважали, що ушкодилось 100 % акросом спермійів; АК<sub>зр</sub> – активність акрозину в дослідному зразку. Вимірювання проводили фотометрично кінетичним методом, фіксуючи зростання екстинкції Na-бензоїл-L-аргініну протягом 1 хв при довжині хвилі 259 нм.

Виживаність спермійів псів визначали за тривалістю інкубування в термостаті при температурі 38 °С та виражали у хвилинах від початку інкубування. Кожних 30 хв оцінювали активність спермійів і підраховували час до повного припинення руху.

Статистичний аналіз результатів дослідження здійснювали за допомогою пакета прикладного програмного забезпечення Statistica 8.0 (Statsoft, США).

**Результати й обговорення.** Додавання фосфатидилхоліну, який міститься у високоочищеному вигляді в гепатопротекторному препараті “Ессенціале®” до середовища в концентрації 20–25 мг/мл забезпечило високу активність спермійв, цілісність і функціональність їх плазматичних мембран на рівні, який вірогідно не відрізнявся від аналогічних показників за використання цільного жовтка після розморожування. Водночас, нижча концентрація фосфатидилхоліну (10 та 15 мг/мл) не забезпечила відповідного захисту плазматичних мембран спермійв, цілісність яких була нижчою відповідно на 11,7 ( $p < 0,001$ ) та 9,3 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таблиця 1

**Показники якості спермійв псів в зразках заморожених в середовищі з різним вмістом фосфатидилхоліну після розморожування,  $M \pm m$ ,  $n=9$**

Концентрація ессенціале, мл / фосфатидилхоліну, мг/мл	Активність, %	ЦПМ, %	ТГНС, %	ЗА, %	Виживаність, год.
цільний жовток (К)	54,7±1,6	65,4±2,4	67,7±1,2	59,9±1,5	5,9±0,49
0,2 / 10	43,0±2,1 <sup>3</sup>	53,7±2,2 <sup>3</sup>	60,8±1,3 <sup>2</sup>	41,3±1,6 <sup>3</sup>	3,1±0,32 <sup>3</sup>
0,3 / 15	45,4±2,3 <sup>2</sup>	56,1±2,5 <sup>2</sup>	64,1±1,7	52,7±1,3 <sup>2</sup>	4,4±0,51 <sup>1</sup>
0,4 / 20	53,6±2,2	63,6±2,0	68,6±1,6	62,0±1,7	6,1±0,53
0,5 / 25	48,8±1,9 <sup>1</sup>	66,8±2,3	70,1±1,9	55,4±1,1 <sup>1</sup>	5,8±0,52
0,6 / 30	47,9±1,7 <sup>1</sup>	57,9±1,9 <sup>1</sup>	67,9±1,5	54,6±1,8 <sup>1</sup>	5,3±0,47

*Примітка:* У цій та наступній таблиці різниця між даними, позначеними наступним знаком, є вірогідною порівняно з контролем: <sup>1</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>3</sup> –  $p < 0,001$ .

Додавання препарату “Ессенціале®” у кількості 0,2 та 0,3 мл призвело до вірогідного зниження показника активності, цілісності плазматичних та акросомальних мембран спермійв псів після розморожування відносно середовища з цільним жовтком, що вказує на те, що ця кількість фосфатидилхоліну не є достатньою у середовищі для захисту морфологічних структур спермійв, зокрема плазматичних та акросомальних мембран, що й проявляється в зниженій кількості спермійв з прямолінійно-поступальним рухом та тривалості виживання спермійв при інкубації. Водночас, збільшені концентрації фосфатидилхоліну до 30 мг/мл або 0,6 мл ессенціале також призвело до зниження якості спермійв псів після розморожування, зокрема активності спермійв, цілісності плазматичних та акросомальних мембран на 6,8 % ( $p < 0,05$ ), 7,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,3 ( $p < 0,05$ ) відповідно, відносно середовища із жовтком. В той же час, збільшення концентрації фосфатидилхоліну у середовищі на відміну від нижчих його концентрацій не призвело до вірогідного зниження виживаності спермійв після розморожування, що можна пояснити його токсичністю та осмотичними змінами середовища, які не сприяють стабілізації морфологічних структур спермійв при заморожуванні та узгоджуються з даними деяких авторів, які використовують високі концентрації лецитину для кріоконсервування сперми баранів [6].

Комбіноване використання фосфатидилхоліну з бичачим сироватковим альбуміном у концентрації 1 % показало найвищу ефективність серед інших досліджуваних концентрацій (0,25, 0,5 %): показники якості спермійв були вірогідно вищими порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2

**Показники якості спермійв псів після розморожування за використання фосфатидилхоліну (20 мг/мл) з БСА в середовищі для заморожування,  $M \pm m$ ,  $n=9$**

Концентрація БСА, %	Активність, %	ЦПМ, %	ТГНС, %	ЗА, %	Виживаність, год.
0 (К)	53,9±2,2	66,3±2,3	68,5±2,1	60,3±1,5	6,1±0,49
0,25	55,8±2,3	73,9±2,5 <sup>1</sup>	67,6±1,9	59,7±1,3	6,6±0,47
0,5	61,2±2,5 <sup>1</sup>	75,2±2,4 <sup>1</sup>	65,9±1,6	67,6±1,8 <sup>2</sup>	7,0±0,51
1	62,4±2,1 <sup>1</sup>	75,7±2,1 <sup>2</sup>	74,6±1,8 <sup>1</sup>	65,5±1,6 <sup>1</sup>	7,7±0,50 <sup>1</sup>

Додавання БСА у концентрації 0,5 % проявило протекторну та синергічну дію тільки за показниками активності спермій, цілісності плазматичних і акросомальних мембран, які були вищими на 7,3 ( $p < 0,05$ ), 8,9 ( $p < 0,05$ ) та 7,1 % ( $p < 0,01$ ) відповідно порівняно з контролем. Використання 0,25 % ( $p < 0,05$ ) БСА вірогідно підвищило показник цілісності плазматичних мембран порівняно з контролем.

Позитивний вплив комбінованого використання фосфатидилхоліну та БСА на плазматичні мембрани спермій, очевидно, пояснюється здатністю фосфоліпідів формувати комплекси з білками, які, взаємодіючи з полярними головками ліпідів та інтегральними білками плазматичної мембрани, знижують втрати холестерину та руйнування їх білково-ліпідних комплексів у процесі заморожування, підвищуючи їх текучість [10].

## ВИСНОВКИ

1. Додавання розчину фосфатидилхоліну (“Ессенціале<sup>®</sup>”) в концентрації 20 мг/мл проявило ефективність захисту плазматичних і акросомальних мембран спермій на рівні використання цільного жовтка курячого яйця.

2. Комбіноване використання ессенціале у концентрації 20 мг/мл та бичачого сироваткового альбуміну у концентрації 1 % забезпечило зростання кількості спермій з неушкодженою плазматичною та акросомальною мембранами спермій відповідно на 14,2 ( $p < 0,001$ ) та 8,6 %, підвищення активності й виживаності відповідно на 15,7 ( $p < 0,05$ ) та 26,2 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчити ефективність дослідженої комбінації фосфатидилхоліну та БСА в складі середовища для кріоконсервування сперми псів окрім *in-vitro* методів, також *in-vivo* методами зокрема штучного осіменіння сук.

## THE EFFECT OF ESSENTIALE<sup>®</sup> AND BSA ADDITION TO THE FREEZING EXTENDER ON DOG SEMEN QUALITY AFTER THAWING

*A. R. Korbetskyy, M. M. Sharan*

Institute of Animal Biology of NAAS

## S U M M A R Y

The results of a study on the effect of different concentrations of phosphatidylcholine contained in Essentiale<sup>®</sup> on plasma membrane and acrosome integrity of dog spermatozoa after thawing and its combined use with bovine serum albumin (BSA). Addition to the dog semen freezing extender of phosphatidylcholine at a concentration of 20 mg/ml provided the sperm progressive motility, membrane functionality, longevity, plasma membrane and acrosome integrity after thawing at a level not significantly different from samples that have been frozen in freezing extender with a whole chicken egg yolk. The combined use of phosphatidylcholine with BSA at concentrations of 0,5 and 1 % provided significantly higher motility by 7,3 % and 8,5 %, respectively ( $p < 0,05$ ), plasma membrane integrity by 8,9 and 9,4 % ( $p < 0,05$ ), the number of sperm with intact acrosomes by 7,3 % ( $p < 0,01$ ) and 5,2 ( $p < 0,05$ ), respectively. While functionality of plasma membranes and sperm longevity after thawing were significantly higher only with 1 % BSA concentration by 6,1 % and 26,23 % respectively compared to extender, which contained only phosphatidylcholine at concentration of 20 mg/ml.

# ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ ЭССЕНЦИАЛЕ® И БСА В СРЕДУ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА КАЧЕСТВО СПЕРМИЕВ КОБЕЛЕЙ ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ

*А. Р. Корбецкий, Н. М. Шаран*

Институт биологии животных НААН

## А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты исследований по изучению влияния различных концентраций фосфатидилхолина, содержащийся в препарате Эссенциале® на плазматические мембраны и акросомы спермиев кобелей после размораживания, а также его комбинированное использование с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Добавление в среду для криоконсервации спермы собак фосфатидилхолина в концентрации 20 мг/мл обеспечило показатели активности спермиев, целостности и функциональности мембран, сохранности акросом и выживаемости после размораживания на уровне, достоверно не отличалось от образцов, которые были заморожены в среде с цельным куриным желтком. Комбинированное использование фосфатидилхолина с БСА в концентрации 0,5 и 1 % обеспечило достоверно высокую активность, на 7,3 и 8,5 % соответственно ( $p < 0,05$ ), целостность плазматических мембран на 8,9 и 9,4 % ( $p < 0,05$ ), количество спермиев с неповрежденной акросомой на 7,3 % ( $p < 0,01$ ) и 5,2 ( $p < 0,05$ ) соответственно. Тогда как показатель функциональности плазматических мембран и выживаемости спермиев кобелей после размораживания был достоверно выше только при концентрации БСА 1 % на 6,1 % и 26,23 % соответственно по сравнению со средой, содержащей только фосфатидилхолин в концентрации 20 мг/мл.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Seager S. W. J.* Collection, storage, and insemination of canine semen / S.W.J. Seager, W.S. Fletcher // *Laboratory Animal Science*. — 1972. — 22. — P. 177–82.
2. *Farstad W.* Assisted reproductive technology in canid species / W. Farstad // *Theriogenology*. — 2000. — V.53. — P. 175–186.
3. *Schäfer-Somi Sabine.* Effects of semen extender and semen processing on motility and membrane integrity of frozen thawed dog spermatozoa / [S. Schäfer-Somi, S. Kluger, Knapp Elzbieta, D. Klein, C. Aurich] // *Theriogenology*. — 2006. — 66. — P. 173–182.
4. *Verstegen J. P.* Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies / J. P. Verstegen, K. Onclin, M. Iguer-Ouada // *Theriogenology*. — 2005. — 64. — P. 720–33.
5. *England G.C.W.* Cryopreservation of dog semen: a review / G.C.W. England // *J. Reprod. Fertil.* — 1993. — 47. — P. 243–255.
6. *Forouzanfar M.* In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen / [M. Forouzanfar, M. Sharafi, S.M. Hosseini] // *Theriogenology*. — 2010. — 1. — 73. — P. 480–487.
7. *Kuznetsov A. V.* Laboratory Protocol Lactate Dehydrogenase / A. V. Kuznetsov, E. Gnaiger // *Cytosolic marker enzyme Mitochondrial Physiol. Network*. — 2010. — V.08. — P.1–8.
8. *Pinto C. R.* Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa / C.R. Pinto, D.M. Kozink // *Anim. Reprod. Sci.* — 2008, 3, 104. — P. 450–455
9. *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.135–140.
10. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев, — 1991. — 198 с.

