

## **ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАМОРОЖУВАННЯ СПЕРМИ БУГАЇВ ЗА ВВЕДЕННЯ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ В СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ**

*І. М. Яремчук, М. М. Шаран, О. Б. Андрушко, С. Б. Корнят*

Інститут біології тварин НААН

*Наведено результати досліджень з вивчення активності ензимів антиоксидантного захисту та виживання спермійв за додавання відновленої форми глутатіону в розріджувач еякулятів бугаїв. Додавання антиоксиданту до розріджувача в концентрації 2,5 та 5,0 мМ забезпечує підвищення активності спермійв у нативній спермі, що в свою чергу покращує виживання деконсервованої сперми до 56,4 та 58,4 %. У розморожених зразках, де у склад розріджувача був доданий глутатіон у концентрації 5,0 мМ, швидкість руху спермійв на прямих відрізках шляху була на 28 % вища від контролю. Додавання до розріджувача відновленої форми глутатіону у свіжоотриманій розбавленій спермі стимулює активність СДГ, яка за концентрації 1,25, 2,5 та 5,0 мМ вказаного антиоксиданту вища від контролю, відповідно, у 2,1, 2,7 та 5,2 рази.*

Запліднювальна здатність спермійв бугаїв величина непостійна й залежить від численних чинників, зокрема, складу розріджувачів та технологічних процесів підготовки еякулятів до заморожування і розморожування спермодоз. Так, компоненти розріджувачів зменшують негативний ефект холодового шоку й забезпечують цілісність акросоми і плазматичних мембран, що своєю чергою визначає здатність до використання субстратів, рухливість і запліднюючу здатність спермійв [1, 4]. Однак, не завжди рухливість спермійв характеризує запліднюючу здатність статевих клітин. Це зумовлено тим, що у процесі запліднення беруть участь ще й протеолітичні ензими, які локалізовані в акросомі. Тому для вдосконалення існуючих розріджувачів необхідно враховувати як збереження метаболічної активності, так і цілісності мембран, зокрема, акросоми спермійв [3].

Забезпечити вказані властивості розріджувачів можна використанням у їх складі антиоксидантів. Зокрема, численними дослідженнями встановлена важливість оптимального рівня антиоксидантного захисту свіжоотриманих та розріджених еякулятів бугаїв для забезпечення фізіологічних характеристик спермійв [2, 4]. При цьому, доведена необхідність нормалізувати рівень активності антиоксидантних ензимів у спермі. Така потреба у використанні антиоксидантів зумовлена процесами, що протікають у спермі під час технологічної підготовки до заморожування еякулятів. Так, заморожування сперми супроводжується активуванням мембранозв'язаних ензимів та підвищенням процесів вільнорадикального окиснення жирних кислот і, як наслідок, руйнуванням ліпопротеїнових комплексів й мембран клітин [5, 6]. Вказані зміни призводять до зниження резистентності і рухливості, втрати основної здатності спермійв — запліднювати ооцит.

Запобігають неконтрольованим процесам окиснення присутні в еякулятах природні антиоксиданти (відновлена форма глутатіону, аскорбінова кислота, вітамін Е та ін.) та ензими антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза). Проте, в процесі технологічної підготовки сперми до кріоконсервації, антиоксидантний захист послаблюється, а окремі його ланки втрачаються. Дефіцит сполук з антиоксидантними властивостями поповнюють їх додаванням у розріджувачі еякулятів та середовища для заморожування сперми [4–7].

Тому метою наших досліджень було встановлення ефективності криоконсервування сперми бугаїв за додавання глутатіону до середовища для заморожування.

**Матеріали і методи.** Від 5 бугаїв голштинської породи у Львівському НВЦ «Західплемресурси» сперму отримували на штучну вагіну, до ранкової годівлі, з режимом використання плідників дуплетна садка два рази на тиждень. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), густиною під мікроскопом (у роздавненій краплі) і активністю спермійів (%). Досліджували динамічні показники нативної сперми, після її розбавлення та розморожування. Рухливість і кількість живих спермійів (%) визначали під мікроскопом з використанням відеокамери і програмного забезпечення SpermVision, концентрацію спермійів у еякуляті (млрд/мл) визначали фотометром SDM5. Для досліджень відбирали еякуляти з 80 % і більше живих спермійів та концентрацією більше 0,7 млрд. спермійів в 1 мл. Кожен еякулят ділили на чотири частини. Одну частину еякуляту розбавляли лактозо-жовтковим середовищем (контроль), інші три частини — аналогічним розріджувачем з додавання відновленої форми глутатіону у дозах 1,25 (1 дослідна), 2,5 (2 дослідна) і 5,0 мМ (3 дослідна). Кінцева концентрація спермійів 15 млн. клітин у спермодозі. Після розбавлення сперму еквілібрували 4 год. за температури – 4 °С і заморожували в парах рідкого азоту (мінус 120 °С).

Після еякуляції спермії зазнають значного окисного навантаження, яке супроводжується окисненням ліпідів і білків мембран статевих клітин і, як наслідок, знижуються фізіологічні якості і запліднююча здатність спермійів [8, 9]. Вплив розріджувачів на окисні процеси вивчали у свіжоотриманих еякулятах та після розморожування. Запліднюючу здатність спермійів після розморожування визначали за активністю окисних ферментів: сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦХО) [10, 11].

**Результати й обговорення.** Про позитивний вплив антиоксиданту на якість спермійів свідчить рівень фізіологічних показників — активність та виживання статевих клітин у розріджених еякулятах (табл. 1). Так, за розбавлення еякулятів лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем активність спермійів до заморожування становила  $80,65 \pm 1,12$ , а виживання статевих клітин після розморожування становило 53,0 %.

*Таблиця 1*

**Активність спермійів за дії антиоксиданту в розріджувачі, n=5; M±m**

| Проби сперми | Активність спермійів, % |                  | Відсоток живих спермійів після розморожування, % |
|--------------|-------------------------|------------------|--|
|              | Розбавленій             | розмороженій     |  |
| Контрольна   | $80,65 \pm 1,12$        | $42,81 \pm 1,68$ | 53,0   |
| 1 дослідна   | $81,58 \pm 2,12$        | $45,12 \pm 1,06$ | 55,3   |
| 2 дослідна   | $81,91 \pm 1,48$        | $46,21 \pm 1,32$ | 56,4   |
| 3 дослідна   | $82,33 \pm 1,16$        | $48,11 \pm 1,18$ | 58,4   |

Додавання антиоксиданту до розріджувача в концентрації 2,5 та 5,0 мМ забезпечує підвищення активності спермійів у нативній спермі, що в свою чергу покращує виживання деконсервованої сперми до 56,4 та 58,4 %.

Отже, лактозо-жовтково-гліцериновий розріджувач з додаванням антиоксиданту ефективно забезпечує виживання статевих клітин до і після розморожування.

Поряд з визначенням активності критерієм оцінки є визначення динамічних показників руху клітин, оскільки рухливі спермії можуть бути морфологічно нормальними і не запліднювати яйцеклітину. Результати досліджень показали, що у свіжій спермі містилося в середньому  $88,5 \pm 0,45$  % повноцінних спермійів з прямолінійно-поступальним рухом (табл. 2). Порівнюючи показники пройденої відстані за середньою траєкторією руху спермійів (DAP) слід відзначити, що це значення становило 31,84 мкм. у контрольних зразках сперми а у дослідних – 33,37 мкм. Після розморожування результати дослідження пройденої відстані спермійів по прямій (DSL) засвідчили, що середнє значення цієї динамічної характеристики у

досліджуваних зразках до заморожування становило 20,43 і 22,69 мікрметра відповідно, а після розморожування цей показник спермійв дослідних проб на 21 % вищий від контролю.

Таблиця 2

**Динамічні характеристики сперми бугаїв-плідників за дії відновленого глутатіону в розріджувачі, n=5**

| Показники сперми | Свіжо-отримана | Розбавлена середовищем |            | Розморожена сперма |            |
|------------------|----------------|------------------------|------------|--------------------|------------|
|                  |                | Контроль               | 3 дослідна | Контроль           | 3 дослідна |
| ППР, %           | 88,5±0,45      | 80,65±1,12             | 82,33±1,16 | 42,81±1,68         | 48,11±1,18 |
| DAP, мкм         | 34,32          | 31,84                  | 33,37      | 22,34              | 28,72      |
| DCL, мкм         | 70,79          | 60,46                  | 64,93      | 68,98              | 65,32      |
| DSL, мкм         | 24,72          | 20,43                  | 22,69      | 18,17              | 20,52      |
| VAP, мкм/сек     | 79,87          | 70,41                  | 74,29      | 35,64              | 38,92      |
| VSL, мкм/сек     | 64,52          | 60,88                  | 60,21      | 35,21              | 48,36      |
| ALH, мкм         | 7,05           | 6,16                   | 6,94       | 8,34               | 7,87       |

*Примітка:* DCL — шлях криволінійного руху (мікрон); DAP — шлях вирівняного руху (мікрон); DSL — шлях прямолінійного руху (мікрон); VAP — швидкість на вирівняних відрізках шляху (мкм/сек); VSL — швидкість на прямих відрізках шляху (мкм/сек); ALH — середнє бокове відхилення головки (мікрон);

Характеризуючи такий динамічний показник як швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL), варто зазначити, що він майже не відрізнявся у контрольному та дослідному зразках до заморожування. Проте, у розморожених дослідних зразках, де у склад розріджувача був доданий глутатіон у концентрації 5,0 мМ, швидкість на прямих відрізках шляху була на 28 % вища ( $p < 0,05$ ).

Для об'єктивного виявлення динаміки якісних показників розмороженої сперми проведені дослідження з визначення активності окисних ензимів. Виявлені відмінності активності розморожених спермійв підтверджуються активністю окисних ензимів. Вивченням ферментів-маркерів запліднюючої здатності спермійв за додавання антиоксиданта до розріджувача виявлено, що у контрольних пробах (свіжоотримана розбавлена сперма) активність СДГ становить 11,3±4,27, а ЦХО 45,3±4,70 (табл. 3).

Таблиця 3

**Вплив відновленого глутатіону на активність ензимів розрідженої сперми бугаїв, n=5; M±m**

| Проби сперми | Активність окисних ензимів у спермі, од/(год×0,1 мл С) |            |              |           |
|--------------|--|------------|--------------|-----------|
|              | Свіжоотримана  |            | Розморожена  |           |
|              | СДГ  | ЦХО        | СДГ          | ЦХО       |
| Контрольна   | 11,3±4,27  | 45,3±4,70  | 20,5±5,04    | 45,5±8,37 |
| 1 дослідна   | 24,3±9,24  | 38,1±4,71  | 29,3±5,84    | 36,4±6,20 |
| 2 дослідна   | 31,0±7,66*   | 29,1±5,70* | 42,3±6,80*   | 31,0±6,00 |
| 3 дослідна   | 59,2±13,39*  | 22,0±6,82* | 50,8±4,32*** | 27,5±7,39 |

Після заморожування-розморожування значення СДГ зростає на 81,4%, а ЦХО — не змінюється. Додавання до розріджувача відновленої форми глутатіону у свіжоотриманій розбавленій спермі стимулює активність СДГ, яка при концентраціях 1,25, 2,5 та 5,0 мМ вказаного антиоксиданту вища від контролю, відповідно, у 2,1; 2,7 та 5,2 разів. При цьому, активність ЦХО знижується і, за концентрації глутатіону 1,25 мМ нижча від контролю на 18,8 %, 2,5 мМ — на 55,6 % та при 5,0 мМ у 2 рази. Виявлена залежність активності ензимів зберігається і після розморожування. Однак, різниця між контрольними та дослідними пробами для активності СДГ менша і становить 42,5 %, 2,0 та 2,5 рази, відповідно, за використання 1,25, 2,5 та 5,0 мМ відновленої форми глутатіону.

При цьому, активність ЦХО, навпаки, знижується, порівняно до контролю, на 25,0 %, 46,7 % та 65,4 % за використання концентрації відновленої форми глутатіону, відповідно, 1,25, 2,5 та 5,0 мМ.

## В И С Н О В К И

1. Додавання відновленого глутатіону до розріджувача в концентрації 2,5 та 5,0 мМ забезпечує підвищення активності сперміїв у нативній спермі, що, в свою чергу, покращує виживання деконсервованої сперми до 56,4 та 58,4 %.

2. У розморожених зразках, за додавання глутатіону у склад розріджувача в концентрації 5,0 мМ, швидкість на прямих відрізках шляху була на 28 % вища, порівняно з контролем.

3. Додавання до розріджувача відновленої форми глутатіону у свіжоотриманій розбавленій спермі стимулює активність СДГ, яка при концентрації 5,0 мМ вказаного антиоксиданта вища від контролю у 5,2 рази, з одночасним зниженням активності ЦХО.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження з використання відновленого глутатіону у складі розріджувача еякулятів бугаїв будуть поглиблені вивченням антиоксидантного захисту та продукції пероксидації ліпідів сперміїв

## **EFFECTIVENESS OF FREEZING BULL SPERM FOR THE INTRODUCTION OF REDUCED GLUTATHIONE IN THE MEDIUM FOR CRYOPRESERVATION**

*I. M. Yaremchuk, M. M. Sharan, O. B. Andrushko, S. B. Kornyat*

Institute of Animal Biology of NAAS

## S U M M A R Y

The results of studies on the antioxidant defense enzymes activity and survival of spermatozoa by adding reduced glutathione in diluent ejaculates bulls. Adding an antioxidant to a diluent in a concentration of 2.5 mM and 5.0 enhances the motility of native sperm in the semen, which in turn improves survival thawed sperm to 56.4 and 58.4 %. In thawed samples, where the diluent was added in a concentration of glutathione is 5.0 mM, the velocity of spermatozoa on the straight path segments was 28 % higher than the control. Addition of reduced glutathione to the diluted semen stimulates the activity of LDH, which at concentrations of 1.25, 2.5 and 5.0 mM of the antioxidant above control, respectively, 2.1, 2.7 and 5.2 times.

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В СРЕДУ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ**

*И. М. Яремчук, Н. Н. Шаран, О. Б. Андрушко, С. Б. Корнят*

Институт биологии животных НААН

## А Н Н О Т А Ц И Я

Приведены результаты исследований по изучению активности ферментов антиоксидантной защиты и выживанию спермиев при добавлении восстановленной формы глутатиона в разбавитель эякулятов быков. Добавление антиоксиданта к разбавителю в концентрации 2,5 и 5,0 мМ обеспечивает повышение активности спермиев в нативной

сперме, що в свою чергу покращує виживаність деконсервованої сперми до 56,4 і 58,4 %. В разморожених зразках, де в розбавитель був доданий глутатіон в концентрації 5,0 мМ, швидкість руху сперматозоїдів на прямих ділянках шляху була на 28 % вище контролю. Додавання відновленої форми глутатіону до розбавленої сперми стимулює активність СДГ, яка при концентраціях 1,25, 2,5 і 5,0 мМ вказаного антиоксиданта вище контролю, відповідно, в 2,1, 2,7 і 5,2 рази.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Давиденко В. М. Якісні показники сперми плідників різних порід у залежності від режиму заморожування: зб. «Розведення і штучне осіменіння великої рогатої худоби» / В. М. Давиденко, Н. П. Чунсіна. — К.: Урожай, 1981. — Вип. 13. — С. 62–65.
2. *Осташко Ф. И.* Биотехнология воспроизводства крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. — К.: Аграрна наука, 1995. — 184 с.
3. *Cross N. L.* Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm / N.L. Cross, P. Morales, J. W. Overstreet // *Gamete Res.* — 1986. — 15. — P. 213–226.
4. *Остапів Д. Д.* Роль антиоксидантів у енергетичному обміні сперміїв бугаїв / Д. Д. Остапів // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. — Львів, 2003. — Т.5, № 3, Ч.2. — С. 78–82.
5. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa / A. Koppers, G. De Iuliis, J. Finnie, R. Aitken // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* — 2007. — Vol. 93. — P. 3199–3207.
6. *Slaweta R.* The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen sperm / R. Slaweta, T. Liaskowska // *Anim. Reprod. Sci.* — 1987. — Vol. 13. — P. 249–253.
7. *Шаран М. М.* Підвищення ефективності штучного осіменіння корів і телиць / М. М. Шаран — Львів, 2009. — 38 с.
8. *Wagtendouk A. M.* Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract / A. M. Wagtendouk, R. M. Haring, L. M. Kaal-Lansbergen, J. H. Den Daas // *Theriogenology.* — 2000. — Т. 54. — P. 57–67.
9. Фізіолого-біохімічні методи дослідження у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / Довідник. під ред. В. В. Влізло — Львів, 2004. — 399 с.
10. *Чухрій Б. М.* Колориметричний спосіб визначення активності сукцинатдегідрогенази в спермі бугаїв / Б. М. Чухрій, Л. О. Клевець, Д. Д. Остапів // Вісник аграрної науки. — 1995. — № 11. — С. 73–76.
11. *Остапів Д. Д.* Інтенсивність окисно-відновних процесів у спермі бугаїв під впливом антиоксидантів / Д. Д. Остапів, С. П. Хомин, С. Й. Кава, В. І. Міщенко // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького. — Львів, 2000. — Т. 2, Ч.1. — С. 217–220.