

ОКИСНО-ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ І ЯКІСТЬ СПЕРМІЇВ ЗА ДОДАВАННЯ ХОЛІН-ХЛОРИДУ В СПЕРМУ БУГАЇВ

І. М. Яремчук, С. В. Горчин, М. М. Шаран, Д. Д. Остапів

Інститут біології тварин НААН

Вивчено вплив холін-хлориду у складі розріджувача еякулятів бугаїв на окисно-відновні процеси і виживання спермій. Встановлено, що за наростаючих доз холін-хлориду (1,5, 3,0 і 6,0 %) у розрідженій спермі пропорційно знижується інтенсивність окисно-відновних процесів. При максимальній концентрації холін-хлориду (6,0 %) дихальна активність нижча на 45,8 % ($p < 0,05$), відновна здатність — на 22,3 % і активність сукцинатдегідрогенази — на 23,6 %, порівняно з контролем. Тенденція до зниження активності сукцинатдегідрогенази свідчить про включення холін-хлориду в мембрани спермій, що змінює структуру і знижує їх проникність та зменшує поступлення субстратів, зокрема, сукцинату в ЦТК. Аналогічно, холін-хлорид, доданий у дозі більше 1,5 % у розріджені еякуляти, гальмує активність човникових механізмів транспорту електронів (протонів) зі спермій у позаклітинний простір. Зниження інтенсивності окисних процесів проявляється вищою збереженістю фізіологічних характеристик статевих клітин при існуванні в розріджених еякулятах. Найвище виживання спермій забезпечує додавання 1,5 % холін-хлориду в розріджені еякуляти бугаїв.

Організація служби штучного осіменіння тварин передбачає створення запасу «банку» кріоконсервованих репродуктивних клітин. Проведеними дослідженнями встановлено, що в процесі кріоконсервації у частини спермій порушується структура. Зокрема, ушкоджується плазматична мембрана, що супроводжується витоком ензимів, в тому числі і тих, які безпосередньо беруть участь у процесах запліднення. Крім того, руйнуються мітохондрії, основні енергогенеруючі органели статевих клітин [1]. Як наслідок процесу заморожування у спермій розморожених еякулятів знижуються інтенсивність використання фруктози й інших субстратів і, загалом, енергетичних процесів, що зумовлює втрату рухливості та загибель статевих клітин [7].

Для створення високоефективних і простих у реалізації способів кріоконсервації гамет, які б відповідали сучасним вимогам виробництва, перед собою ставили завдання досягти високої збереженості репродуктивних клітин шляхом застосування композиційних кріопротекторів різнопланової кріозахисної дії, в тому числі, біологічно активних речовин [8]. При цьому, розроблення складу кріоконсерванту для заморожування сперми проводили на основі даних літератури про позитивну роль метильних груп при включенні їх у молекулу гліцерину [2, 3]. Серед сполук, які здатні постачати метильні групи є холін, зокрема холін-хлорид, який є однією з фракцій лецитину та виконує функцію метильючого агенту. У зв'язку з цим, апробовано використання холін-хлориду в розріджених еякулятах бугаїв для покращення фізіологічних і біохімічних характеристик спермій.

Мета досліджень — вивчити інтенсивність окисно-відновних процесів і виживання спермій за додавання холін-хлориду в розріджені еякуляти бугаїв.

Матеріали і методи. Дослідження проведені в Інституті біології тварин НААН та ЛНВЦ "Західплемресурси". Для вивчення дії холін-хлориду на статеві клітини використано свіжоотримані еякуляти 7 бугаїв таких фізіологічних характеристик: об'єм — 3–5 мл ($3,4 \pm 0,20$ мл), концентрація — $0,71 - 1,12 \times 10^9$ клітин /мл ($0,99 \pm 0,05 \times 10^9$ клітин /мл), кількість

живих сперміїв — 65–85 % (74,3±1,49 %). Для оцінювання і характеристики впливу холін-хлориду на метаболічну активність статевих клітин еякуляти ділили на частини: контрольну — розріджену 1:4 фосфатно-сольовим буфером (ФСБ; NaCl — 0,8 г, KCl — 0,02 г, Na₂HPO₄ — 0,11 г, KH₂PO₄ — 0,02 г, MgCl₂ — 0,01 г, H₂O — до 100 мл) та дослідні: з додаванням у розріджену сперму 1,5, 3,0 і 6,0 % холін-хлориду [5]. Визначали: виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного поступального руху в збереженій за температури 0–4 °С спермі, дихальну активність (ex tempore) — полярографічно (нг-атом O/0,1мл сперми (С) × хв) у термостатованій комірці (температура 38,5 °С) об'ємом 1,0 мл та відновну здатність — потенціометрично (mV/0,1мл С × хв) з використанням системи відкритих мікроелектродів, які вставляли у полярографічну комірку [6], активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, од/(год.×0,1 мл сперми) [4]. Статистичний аналіз отриманого матеріалу проведено за М.О. Плохінським [9].

Результати й обговорення. Додавання наростаючих доз холін-хлориду в еякуляти бугаїв, розріджених ФСБ, призводить до поступового зниження споживання кисню спермою. Зокрема, внесення 1,5 % холін-хлориду не змінює інтенсивність дихання, яка знаходиться на рівні контролю (3,5 нг-атом O/0,1мл С × хв; табл.).

Таблиця

Окисні процеси і якість сперміїв за додавання холін-хлориду, n = 7, M±m

Умови дослідю	Споживання кисню, нг-атом O/0,1мл С × хв	Відновна здатність, mV/0,1мл С × хв	СДГ, од/(год. × 0,1 мл сперми)	Вживання, год.
Контроль, ФСБ	3,5±0,37	0,09±0,02	42,5±8,93	138,0±19,67
ФСБ з додаванням холін-хлориду, %:				
1,5	3,5±0,52	0,07±0,01	38,7±6,93	150,0±17,75
3,0	2,8±0,47	0,06±0,01	37,5±5,15	132,0±19,90
6,0	1,9±0,51*	0,07±0,02	32,5±5,15	144,0±20,77

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до контролю — * p<0,05

Однак, введення у склад розрідженої сперми 3,0 % холін-хлориду зумовлює тенденцію до зниження споживання кисню (на 20,0 %; p>0,05), а за дози 6,0 % — призводить до вірогідного зменшення величини досліджуваного показника (45,8 %; p<0,05).

Поряд зі зменшенням споживання кисню спермою за додавання холін-хлориду встановлено зниження активності СДГ. Зокрема, за присутності 1,5 % холін-хлориду в складі розрідженої сперми активність ензиму на рівні контрольних зразків (38,7±6,93 од/(год × 0,1 мл сперми), за збільшення концентрації до 3,0 % — знижується на 11,8 % і за 6,0 % холін-хлориду — нижча на 23,6 %.

Подібні зміни виявлені при дослідженні інтенсивності позаклітинного транспорту електронів (протонів) у середовище розрідження сперми. Так, відновна здатність контрольних зразків становить 0,09±0,02 mV/0,1мл С × хв, а за додавання холін-хлориду в розріджену сперму — знижується на 22,3–33,3 %.

Вплив холін-хлориду на інтенсивність окисних процесів призводить до змін виживання сперміїв. Так, введення в склад розрідженої сперми 1,5 % діючої речовини зумовлює тенденцію до підвищення виживання сперміїв на 12 год. (8,0 %). Додавання до сперми, розрідженої ФСБ, вищих доз холін-хлориду (3,0 і 6,0 %) не призводить до підвищення величини даного фізіологічного показника — значення знаходиться в межах 132,0–144,0 год.

Таким чином, оптимальні величини значень показників окисних процесів, які забезпечують максимальне виживання сперміїв проявляються за 1,5 % холін-хлориду в розрідженій спермі.

ВИСНОВКИ

1. Додавання наростаючих доз холін-хлориду (1,5, 3,0 і 6,0 %) в розріджені еякуляти бугаїв пропорційно знижує інтенсивність окисно-відновних процесів у спермі.

2. Активність СДГ при збільшенні концентрації холін-хлориду в розрідженій спермі (1,5, 3,0 і 6,0 %) знижується на 11,8–23,6 %, порівняно з контролем.

3. Холін-хлорид, доданий у дозі більше 1,5 % в розріджені еякуляти, впливає на човникові механізми транспорту електронів (протонів) зі сперміїв у позаклітинний простір.

4. Найвище виживання сперміїв появляється при додаванні 1,5 % холін-хлориду в розріджені еякуляти бугаїв.

Перспективи подальших досліджень. Дослідити інтенсивність окисних процесів та збереженість статевих клітин деконсервованої сперми, замороженої у розріджувачі з холін-хлоридом.

REDOX PROCESS AND SPERM QUALITY WHEN ADDING CHOLINE CHLORIDE IN BULL SPERM

I. M. Yaremchuk, S. V. Gorchin, M. M. Sharan, D. D. Ostapiv

Institute of Animal Biology of NAAS

S U M M A R Y

Influence of choline chloride in bull ejaculate semen diluent on redox processes and spermatozoa survival was studied. It was determined, that by adding increasing doses of choline chloride (1,5; 3,0 і 6,0 %) in diluted semen intensity of redox processes proportionally decreases. At maximum choline chloride concentration (6,0 %) respiration activity is lower on 45,8 % ($p < 0,05$), reduction ability – on 22,3 % and succinate dehydrogenase activity — on 23,6 %, comparing to control. Downward trend of succinate dehydrogenase indicate choline chloride inclusion in spermatozoa membrane, that changes structure and lowers their permeability, but it also decreases substrate receipt, in particular succinate, in citric cycle. Analogically, choline chloride, that was added in doses higher 1,5 % in diluted ejaculates, lowers shuttle mechanisms activity of electron (proton) transport from spermatozoa in extracellular environment. Decrease of oxidative processes intensity manifests in higher preservation of physiological characteristics of spermatozoa by existence in diluted ejaculates. The highest spermatozoa survival is provided by addition of 1,5 % choline chloride in diluted bull ejaculates.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ И КАЧЕСТВО СПЕРМИЕВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ХОЛИН-ХЛОРИДА В СПЕРМУ БИКОВ

И. М. Яремчук, С. В. Горчин, М. Н. Шаран, Д. Д. Остапив

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучено влияние холин-хлорида в составе разбавителя эякулятов быков на окислительно-восстановительные процессы и выживание спермиев. Установлено, что при

увеличении доз холин-хлорида (1,5, 3,0 і 6,0 %) в разбавленной сперме пропорционально снижается интенсивность окислительно-восстановительных процессов. При максимальной концентрации холин-хлорида (6,0 %) дыхательная активность ниже на 45,8 % ($p < 0,05$), восстановительная способность — на 22,3 % и активность сукцинатдегидрогеназы — на 23,6%, по сравнению с контролем. Тенденция к снижению активности сукцинатдегидрогеназы свидетельствует о включении холин-хлорида в мембраны спермиев, что изменяет их структуру и снижает проницаемость, однако уменьшает поступление субстратов, в частности сукцината, в ЦТК. Аналогично, холин-хлорид, добавленный в дозе больше 1,5 % в разбавленные эякуляты, тормозит активность челночных механизмов транспорта электронов (протонов) со спермиев в внеклеточное пространство. Снижение интенсивности окислительно-восстановительных процессов проявляется высшей сохранностью физиологических характеристик половых клеток при существовании в разбавленных эякулятах. Самое высокое выживание спермиев обеспечивает добавление 1,5 % холин-хлорида в разбавленные эякуляты быков.

ЛІТЕРАТУРА

1. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології: підручник / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, Г. М. Калиновський, та ін. // 3-те вид. переробл. та доповн. — Вінниця : Нова Кн., 2011. — 608 с.
2. Яремчук І. М. Ефективність застосування холин-хлориду при надшвидкому заморожуванні ембріонів / І. М. Яремчук // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин та ДНДКІ ветпрепаратів та корм. добавок. — 2008. — Вип. 9, № 4. — С. 209–213.
3. 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.
4. Чухрій Б. М. Колориметричний спосіб визначення активності сукцинатдегидрогенази в спермі бугаїв / Б. М. Чухрій, Л. О. Клевець, Д. Д. Остапів // Вісник аграрної науки. — 1995. — № 11. — С. 73–76.
5. 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.
6. Амперометрическое определение ферроцианида в присутствии субклеточных структур / К. Ф. Штольц, И. М. Мосолова, Л. А. Дронова. Биохимические методы. — М.: Наука, 1980. — С. 147–150.
7. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminoldependent chemiluminescence assay / H. Kobayashi, E. Gil-Guzman, A. M. Mahran et al. // J. Androl. — 2001. — Vol. 22, № 4. — P. 568–574.
8. Tramer F. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa / F. Tramer, F. Rocco, F. Micali et al. // Biol. Reprod. — 1998. — Vol. 59. — P. 753–758.
9. Плохинский Н. А. Биометрия. / Н. А. Плохинский — М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.