

## ВПЛИВ РІЗНИХ ЧИННИКІВ НА ВИЖИВАНІСТЬ ТА ЗДАТНІСТЬ ДО ЗАПЛІДНЕННЯ СПЕРМИ КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ \*

**О. М. Бордун**, кандидат сільськогосподарських наук  
Інститут сільського господарства Північного Сходу НААН України  
**В. І. Халак**, кандидат сільськогосподарських наук  
ДУ Інститут зернових культур НААН України  
**О. С. Грабовська**, кандидат біологічних наук  
Інститут біології тварин НААН України

Наведені результати досліджень впливу різних чинників на виживаність та здатність до запліднення сперми кнурів-плідників. Розкрито деякі закономірності механізму заморожування та розморожування для оптимізації процесу довготривалого зберігання спермій кнурів.

Установлено, що час інкубування свіжоотриманої сперми кнурів при кімнатній температурі 1,5 год. позитивно впливає на якість розмороженої сперми кнурів. Використання швидкості охолодження 1 °С за 1 хв. у температурному діапазоні від 15 до 5 °С не призводить до вірогідного зниження показників якості спермій кнурів після розморожування. Пришвидшення охолодження зменшує тривалість технологічної обробки сперми для кріоконсервування з 180 до 10 хв. У разі 3-годинної еквілібрації сперми кнура показник активності спермій був вищий – 46,7 %.

**Ключові слова:** кнури, сперма, температура, охолодження, еквілібрація, кріоконсервація.

Традиційні методи кріоконсервації сперми кнура, розроблені ще у 70-х роках минулого століття [1,2] і пізніше модифіковані застосуванням соломок [3], не забезпечують стабільності і достатньої ефективності результатів відтворення свиней. Саме тому використання у виробничих умовах заморожено-відталої сперми у світі поки що залишається на досить низькому рівні. У той же час зарубіжні компанії, які займаються відтворенням поголів'я свиней виявляють все більшу зацікавленість до подальшого розвитку біотехнології заморожування сперми кнурів-плідників. Кріоконсервація сперми (*cryopreservation* – метод заморожування і тривалого зберігання сперми в рідкому азоті при температурі -196 °С), уможливорює в короткі строки поліпшувати генотип поголів'я, замінити дорогий імпорт племінних кнурів імпортом їх замороженої сперми, виключити втрати тварин, пов'язані з адаптацією до інших умов годівлі й утримання, запобігти ризику завою патогенної мікрофлори.

Аналіз численних літературних джерел [1–7] з питань кріоконсервації сперми кнура дає можливість зробити наступне узагальнення особливостей цього процесу. По-перше, він свідчить про існування численних ендогенних – фізіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних – видових особливостей сперми, а також екзогенних – середовищних і технологічних – факторів впливу, які в цілому визначають проблемну ситуацію із кріоконсервацією

*\*Автори даної статті висловлюють офіційну подяку директору Сумського державного селекційного центру Юрію Анатолійовичу Отрох за надану практичну допомогу щодо проведення експериментальної частини досліджень.*

у виду тварин *Sus scrofa domesticus*, а тому постає необхідність дослідження кожного з таких факторів окремо, але з урахуванням генотипу кнура. У зв'язку з цим вдосконалення технології кріоконсервації перебуває під постійною увагою науковців країн з високорозвинутим свинарством.

Мета роботи – дослідити вплив на спермії кнурів температури, швидкості охолодження, тривалості еквілібрації (*equilibrate* – уповільнена фаза консервації сперми при температурі 5,0 °С) з метою розкриття певних закономірностей механізму заморожування та розморожування для оптимізації процесу довготривалого зберігання гамет кнурів.

Експериментальну частину досліджень проведено в умовах лабораторії тваринництва і кормовиробництва Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН України та

Сумського державного селекційного центру. Сперму від повновікових кнурів – плідників великої білої породи ( $n = 5$ ) та породи ландрас ( $n = 3$ ) отримували мануальним методом, при цьому відбирали концентрований еякулят, неактивований секретом придаткових залоз, в другій фазі еякуляції і частково в третій [8]. Відбір сперми проводили від високопродуктивних кнурів-плідників віком 24–36 місяців порід велика біла в кількості 5 голів та ландрас – 3 голови. Для досліджень використовували 36 еякулятів, оцінювали їх за наступними показниками якості: об'єм, рухливість, концентрація, виживаність [9]. Показники рухливості спермій визначали за допомогою фазово-контрастного мікроскопу з програмним забезпеченням SpermVision, концентрацію спермій – фотометром Sperm Sae.

Сперму, одержану від кнурів після оцінки показників якості, заморожували за техно-логією Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України [1–8]

Результати наукових досліджень – оброблені методом біометричної статистики за методикою М. О. Плохинського [10].

На підставі результатів вивчення фізичних явищ і обмінного процесу при заморожуванні клітин увесь температурний інтервал був розмежований. Процеси, які відбуваються в спермі при заморожуванні відображає шкала запропонована В. О. Осташко [11]. Автор розрізняє наступні температурні інтервали: від 40,0 до 25,0 °C – зона високої активності обмінних процесів; від 25 до -5 °C – зона зниження обмінних процесів і переходу в стан анабіозу; від 0 до -80,0 °C – зона невисоких температур, перехід в стан анабіозу, переохолодження та кристалізації зовнішньої і внутрішньоклітинної води та солей; від -80,0 до -150,0 °C – зона ультранизких температур, при яких відбувається абсолютна кристалізація і рекристалізаційні процеси; від -150,0 до -273,0 °C – зона недоступності кристалізаційних і рекристалізаційних процесів.

Дослідження температурних кривих заморожування сперми сільськогосподарських тварин сприяє використанню в практиці двох режимів заморожування [12]. На першому етапі для безпечної дегідратації важлива повільна швидкість заморожування, на другому – збільшена для послаблення негативної дії гіперконцентрації солей. Повільне заморожування сприяє позаклітинній кристалізації і спермії, які були в концентрованих розчинах зневоднюються. Дегідратація сприяє вітрифікації води всередині клітин та появи маленьких кристалів, які не пошкоджують спермії.

Запліднюваність свиноматок, що підлягають осіменінню значною мірою залежить від якості застосованої сперми. Тому одержану сперму використовують для осіменіння лише після попередньої її оцінки. На підставі оцінювання сперми можна зробити висновок не лише про придатність її для осіменіння свиноматок, а й про можливість використання плідника від якого отримано цю сперму для відтворення стада.

Згідно з літературними даними [8] сперму для заморожування потрібно відбирати з рухливістю не менше 7 балів і концентрацією не нижче 150 млн/мл.

Показники якості сперми кнурів-плідників різних генотипів наведено в таблиці 1. Встановлено, що кращими показниками за об'ємом еякуляту та рухливістю спермій характеризувалися тварини великої білої породи. Різниця за вказаними кількісними ознаками становила 36,0 мл та 4,1 % відповідно. За концентрацією спермій в 1 мл кнури-плідники породи ландрас переважали ровесників великої білої породи на 6,2 млн/мл, або 1,71 %.

### 1. Показники якості сперми піддослідних тварин

Генотип	Кількість еякулятів, шт.	Об'єм еякуляту, мл	Концентрація, млн/мл	Рухливість спермій, %
---------	--------------------------	--------------------	----------------------	-----------------------

Велика біла	22	248,0 ± 16,85	356,0 ± 14,11	90,8 ± 2,36
Ландрас	14	212,0 ± 13,61	362,2 ± 10,32	86,7 ± 2,46

Функціональну активність сперміїв визначали в нативній спермі за умов, що її температура дорівнює 36,0 °С, у розбавленій – 17,0 °С, у фазі еквілібрації – 5,0 °С та після заморожування-відтавання – 26,0 °С (табл. 2)

### 2. Життєздатність сперміїв залежно від температурних умов, n = 36

Температурний режим	Рухливість сперміїв, %
Нативна сперма – 36 °С	92,9 ± 2,65
Розбавлена сперма – 17 °С	88,9 ± 2,38
Охолоджена сперма – 5 °С	41,8 ± 1,94
Деконсервована сперма – 26 °С	36,4 ± 2,21

Аналіз одержаних даних свідчить, що зменшення показників температурного режиму з 36 до 17 °С зумовлює зниження рухливої активності сперміїв на 4,0 % (td = 1,12; P<0,95), з 36 до 5 °С – на 51,1 % (td = 15,57; P>0,999). Різниця за показником «рухлива активність сперміїв» між нативною та деконсервованою спермою дорівнює 56,5 % (td = 16,34; P>0,999).

Характерною особливістю сперміїв кнура порівняно зі сперміями самців інших видів сільськогосподарських тварин є більша варіабельність інтенсивності прямолінійно-поступально-руху за умов різних температур [10].

При зниженні температури рух сперміїв уповільнюється. Порівняльна характеристика рухливості сперміїв при 35 і 20 °С свідчить, що кількість рухомих гамет у другому випадку менша. Спермії кнурів порівняно зі сперміями самців інших видів свійських тварин більш чутливі до холодового шоку. Це відбувається при швидкому охолодженні свіжоеякульованої сперми кнурів від температури тіла до температури нижче 15 °С, що викликає втрату рухливості значною кількістю сперміїв [11].

Тривалість активності сперміїв кнура поза організмом за умов різної температури неоднакова: при температурі 39 °С спермії кнура в нативному еякуляті рухаються до 10 год., при 15–20 °С – до 24 год. зі збереженням до 40,0 % рухливих сперміїв [12].

Дослідження впливу часу інкубації свіжоотриманої сперми кнурів на її активність після розморожування та протягом 3-годинного зберігання свідчать, що 1,5 годинне інкубування свіжоотриманої сперми кнурів при кімнатній температурі позитивно впливає на якість розмороженої сперми кнурів (табл. 3)

### 3. Вплив тривалості інкубування свіжоотриманої сперми при кімнатній температурі на її якість після розморожування, M ± m, n = 22

Тривалість інкубування	Активність сперміїв, %			
	після розморожування	через 1 год.	через 2 год.	через 3 год.
0 год.	31,5 ± 3,32	23,6 ± 3,62	11,6 ± 3,65	5,6 ± 3,91
1 год.	38,2 ± 3,16	32,0 ± 3,25	20,3 ± 3,41	14,3 ± 4,11
1,5 год.	44,4 ± 3,54	38,2 ± 3,71	26,2 ± 3,92	20,2 ± 4,32
2 год.	42,1 ± 3,51	35,9 ± 3,41	23,9 ± 3,22	18,2 ± 3,91

Різниця за показником «активність» через 2 год. після розморожування та на початку інкубування становить 10,6 % (td = 2,19; P>0,95), через 1 год. – 12,3 % (td = 2,47; P>0,95), через 2 год. – 12,3 (td = 2,53; P>0,95), через 3 год. – 12,6 % (td = 2,28; P>0,95).

Після кріоконсервування та розморожування сперми за швидкості 0,05–1,0 °С за 1 хв. значення цих показників суттєво не відрізнялись, хоча зі збільшенням швидкості охолодження простежувалася тенденція до незначного їх зниження (табл. 4). При швидкості охолодження 2 °С за 1 хв. активність сперміїв знижувалася на 8,2 % порівняно з контролем.

**4. Показники якості спермійв кнурів через 20 хв. після розморожування за різної швидкості охолодження в діапазоні від 15 до 5 °С,  $M \pm t$ ,  $n = 16$**

Швидкість охолодження, °С за 1 хв.	Активність спермійв, %			Вживаність, год.
	загальна кількість рухливих спермійв, %	кількість спермійв з прямолінійно-поступальними рухами (ППР), %	відсоток спермійв з ППР до загальної кількості всіх рухливих, %	
0,05 ( контроль)	39,4 ± 3,43	31,1 ± 2,72	78,8 ± 2,62	4,3 ± 0,11
0,50	37,1 ± 3,52	30,3 ± 3,22	81,8 ± 3,32	4,4 ± 0,19
1,0	38,9 ± 3,31	31,9 ± 3,16	82,0 ± 2,91	4,2 ± 0,17
2,0	36,2 ± 2,52*	27,6 ± 2,46*	76,2 ± 2,73*	3,5 ± 0,14**

\*  $P > 0,95$ . \*\*  $P > 0,99$ .

Водночас вживаність спермійв у зразках, заморожених зі швидкістю 0,05, 0,5 та 1,0 °С за 1 хв., суттєво не відрізнялась, що свідчить про певний рівень «толерантності» спермійв кнурів до підвищеної швидкості охолодження у досліджуваному температурному діапазоні. Проте, швидкість охолодження понад 1,0 °С за 1 хв. призводить до вірогідних ушкоджень спермійв і відповідно їх запліднювальної здатності після розморожування.

При вивченні впливу тривалості еквілібрації розбавленої сперми кнурів на показники активності після розморожування з'ясовано, що збільшення тривалості еквілібрації сперми позитивно впливає на її активність після деконсервації (табл. 5). Зокрема, годинна еквілібрація сперми зумовила найнижчу активність спермійв впродовж 3-годинного інкубування.

**5. Вплив часу еквілібрації сперми кнурів при температурі 5 °С на її якість після розморожування,  $M \pm t$ ,  $n = 36$**

Тривалість еквілібрації, год.	Активність спермійв, %			
	після розморожування	через 1 год.	через 2 год.	через 3 год.
1	38,7 ± 3,34	32,6 ± 3,51	27,4 ± 3,64	12,1 ± 3,91
2	43,8 ± 3,16	37,7 ± 3,36	32,5 ± 3,72	17,4 ± 4,12
3	46,7 ± 3,52	40,6 ± 3,84	35,4 ± 3,76	20,3 ± 4,34

За 3-годинної еквілібрації активність спермійв після розморожування була вищою, ніж після 1-годинної на 8,0 % ( $td = 1,64$ ;  $P < 0,95$ ), ця тенденція збереглася і після 3-годинної витримки сперми при температурі 17 °С після відтавання – 8,2 % ( $td = 1,40$ ;  $P < 0,95$ ).

**Висновки**

1. Інкубування свіжоотриманої сперми кнурів при кімнатній температурі від 0 до 2 год. на її активність після розморожування та протягом 3-годинного зберігання показало, що інкубування свіжоотриманої сперми кнурів при кімнатній температурі впродовж 1,5 год. позитивно впливає на якість розмороженої сперми кнурів.

2. При швидкості охолодження 1 °С за 1 хв. у температурному діапазоні від 15 до 5 °С вірогідного зниження показників якості спермійв кнурів після розморожування порівняно із контролем (0,05 °С за 1 хв.) не виявлено. Збільшення швидкості охолодження знижує тривалість технологічної обробки сперми для кріоконсервування з 180 до 10 хв.

3. За рахунок 3-годинної еквілібрації спермійв кнура показник активності спермійв підвищувався і становив 46,7 %.

**Бібліографічний список**

1. Pursel V. G. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure / V. G. Pursel, L. A. Johnson // J. Anim. Sci. – 1975. – V. 40, № 1. – P. 99–102.

2. Баранов Ф. А. Впервые полученные поросята от искусственного осеменения замороженным семенем / Ф. А. Баранов // Животноводство. – 1972. – № 2. – С.68–69.
3. Pettitt M. J. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behaviour during cryopreservation / M. J. Pettitt, M. M Buhr // J. Androl. – 1998. – V. 19. – P. 736–746.
4. Базалевич А. В. Вплив тривалості фази еквілібрації в процесі заморожування спермійв кнура на їх запліднюючу здатність / А. В. Базалевич // Таврійський наук. вісн. – Херсон, 2009. – Вип. 63. – С. 138–142.
5. Коваленко В. Ф. Вплив режиму швидкості заморожування на функціональну активність спермійв кнура / В. Ф. Коваленко, А. В. Базалевич // Таврійський наук. вісн. – Херсон, 2008. – Вип. 58, ч. 11. – С. 225–228.
6. Курбатов А. Д. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных / А. Д. Курбатов, Е. М. Платов, Н. В. Корбан. – М.: Агропромиздат, 1988. – 252 с.
7. Корбецька О. О. Вплив діаметра соломинок та режиму їх деконсервації на активність дифундованих ферментів у процесі криоконсервації сперми кнурів / О. О. Корбецька // Біологія тварин. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 71–75.
8. Protocol. Freezing of Porcine Semen. – Minitube. – 2007. – 10 с.
9. Інструкція із штучного осіменіння свиней. – К.: Аграр. наука. – 2003. – 56 с.
10. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М.: Колос, 1969. – 256 с.
11. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко. – К.: Урожай, 1978. – 256 с.
12. Смирнов И. В. К теории глубокого охлаждения спермы / И. В. Смирнов // Животноводство. – 1974. – № 11. – С. 65–70.