

УДК 636.599.735.51:591.463.1

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕРМІЇВ БУГАЇВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ У РОЗРІДЖУВАЧАХ ЯЄЧНОГО ЖОВТКА І СОЄВОГО ЛЕЦЕТИНУ ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

О. Б. Андрушко¹, М. М. Шаран¹, І. М. Яремчук¹, А. Р. Корбецький¹,
О. П. Панич², І. С. Атаманюк²

¹Інститут біології тварин НААН

²ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок

Вивчали фізіолого-біохімічні характеристики спермій бугаїв за використання розріджувачів з жовтком яєць курей та лецитином сої в процесі технологічної обробки сперми. Встановлено, що у сперміях, за розрідження середовищем «АндроМед» еякулятів бугаїв, нормалізується активність ланок ланцюга дихання мітохондрій та окисних ферментів і підвищується збереженість статевих клітин при інкубуванні за температури 2–4 °С, порівняно з лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем (ЛЖГР). Після кріоконсервування у середовищі з вмістом лецитину сої, активність спермій розмороженої сперми на 11,3 % вища, порівняно з розріджувачем у склад якого входить яєчний жовток. Використання лецитину сої у складі розріджувача підвищує на 12,1 % активність спермій розмороженої сперми після п'яти годин інкубування, порівняно з середовищем з жовтком яєць курей.

Ключові слова: СПЕРМА, СПЕРМІЇ, ОКИСНІ ФЕРМЕНТИ, АКТИВНІСТЬ, ВИЖИВАННЯ, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ, БУГАЙ

Ефективність заморожування сперми самців і, зокрема, бугаїв, значною мірою залежить від складу середовищ, які використовують для розрідження еякулятів. Ці середовища містять речовини, які здатні забезпечувати метаболічну активність статевих клітин у процесі технологічної обробки сперми [1–3]. Зокрема, в склад розріджувачів включають гліцерин і цукри, а джерелом ліпідів служить жовток яєць курей [4, 5]. Однак, існує нове покоління розріджувачів сперми, які не містять жовтка яєць курей, а в якості стабілізатора білково-ліпідних комплексів мембран спермій і цілісності акросоми [6–9] використовують лецитин сої.

Мета роботи — вивчити фізіолого-біохімічні властивості спермій бугаїв за використання розріджувачів з жовтком яєць курей та лецитином сої.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на базі ТзОВ ЛНВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Еякуляти бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання дуплетна садка два рази на тиждень через дві доби. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), активністю (рухливістю; %) та концентрацією спермій (10^9 клітин/мл). Для досліджень відбирали еякуляти з об'ємом більше 2,0 мл, концентрацією – більше $0,7 \times 10^9$ клітин/мл і з 80 % і більше живих спермій.

Для виявлення впливу компонентів розріджувача еякулят ділили на дві частини: одну розбавляли лактозо-жовтково-гліцериним середовищем (ЛЖГР), іншу — розріджувачем з вмістом лецитину сої (АндроМед). Кінцева концентрація спермійів — 15 млн спермійів у дозі. Після розбавлення сперму розфасовували у пайети і еквілібрували 2,5 год при температурі $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Заморожували сперму з використанням процесора Minitub у парах рідкого азоту при температурі $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Розморозували спермодози у водяній бані при температурі $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 25 с.

У свіжоотриманих розріджених еякулятах вивчали активність окисних ферментів: сукцинатдегідрогенази (СДГ; сукцинат акцептор — оксидоредуктаза, КФ.1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО; цитохром С: O_2 -оксидоредуктаза, КФ.1.9.3.1) (од/год·0,1 мл сперми; С) і дихальну активність сперми — полярографічно (нг-атом $\text{O}/(\text{хв}\cdot 0,1\text{ мл сперми (С)}$) у термостатованій комірці (температура $38\text{ }^{\circ}\text{C}$) [10]. Для встановлення частки спожитого Оксигену сперміями аеробним гліколізом використовували інгібітор натрію фторид (10^{-3}M), НАД-залежною ланкою ланцюга дихання мітохондрій — амітал ($5\times 10^{-3}\text{M}$) і термінальною — натрію азид ($5\times 10^{-2}\text{M}$) а для визначення інтенсивності вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот — Na_2EDTA ($6\times 10^{-4}\text{M}$). Рухливість спермійів вивчали у зразках сперми свіжоотриманої збереженої при температурі $2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до припинення прямолінійного поступального руху статевих клітин (год) та після розморозування — протягом п'яти годин інкубування при температурі $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Оцінювання рухливості статевих клітин проводили з використанням мікроскопу Olympus (Японія) та програмного забезпечення SpermVision (Німеччина). Отримані результати опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft Office Excel.

Результати й обговорення

Дослідженнями впливу середовищ розрідження еякулятів на дихальну активність сперми бугаїв не виявлено вірогідної різниці споживання Оксигену, величина значення знаходиться в межах $13,3-15,0$ нг-атом $\text{O}/(\text{хв}\times 0,1\text{ мл С}$; табл. 1). Однак, інтенсивність споживання Оксигену сперміями за рахунок ланок транспорту електронів на акцептор (Оксиген) — відрізняється.

Таблиця 1

Інтенсивність споживання Оксигену спермою бугаїв при розбавленні середовищами тривалого зберігання еякулятів (n = 10; M ± m)

Дихальна активність, нг-атом $\text{O}/(\text{хв}\times 0,1\text{ мл С)}$	Розріджувач	
	ЛЖГР	АндроМед
Сперми	$15,0 \pm 2,06$	$13,3 \pm 1,77$
у тому числі за дії інгібіторів: NaF	$9,5 \pm 0,83$	$11,0 \pm 0,87$
АМ	$7,9 \pm 1,22$	$8,5 \pm 0,83$
АЗ	$5,7 \pm 0,88$	$5,0 \pm 0,87$
Na_2EDTA	$4,2 \pm 0,59$	$5,0 \pm 0,47$

Зокрема, при розбавленні еякулятів бугаїв ЛЖГР величина спожитого Оксигену аеробним гліколізом — $5,5$ нг-атом $\text{O}/(\text{хв}\times 0,1\text{ мл С)}$, що становить 1/3 загальної кількості використаного Оксигену спермою. При розрідженні сперми «АндроМедом» величина досліджуваного показника — $2,3$ нг-атом $\text{O}/(\text{хв}\times 0,1\text{ мл С)}$, що займає лише 17,3 % від загальної кількості спожитого Оксигену. Отже, ЛЖГР, порівняно з «АндроМедом», забезпечує вищу активність аеробного гліколізу у спермі бугаїв. Ймовірною причиною вищої активності аеробного гліколізу є присутність у розріджувачі ЛЖГР лактози, яка може

використовуватись сперміями для ресинтезу АТФ, у тому числі, й вказаним метаболічним шляхом.

Крім того, виявлена відмінність інтенсивності дихання за рахунок НАД-залежної ланки ланцюга дихання мітохондрій. При розрідженні еякулятів ЛЖГР величина спожитого Оксигену вказаною ланкою — 1,6 нг-атом О/(хв×0,1 мл С), а «АндроМедом» — 2,5 нг-атом О/(хв×0,1 мл С). Таким чином, середовище «АндроМед» забезпечує вищий рівень транспорту електронів через НАД-залежну ланку ланцюга дихання мітохондрій сперміїв, порівняно з ЛЖГР. Споживання Оксигену термінальною ланкою ланцюга дихання (цитохромоксидазою) за розрідження сперми ЛЖГР — 2,2 нг-атом О/(хв×0,1 мл С), а «АндроМедом» — 3,5 нг-атом О/(хв×0,1 мл С), що становить, відповідно, 14,7 та 26,3 % від загальної кількості спожитого Оксигену сперміями. Отже, використання розріджувача «АндроМед», порівняно з ЛЖГР, покращує транспорт електронів через термінальну ланку ланцюга дихання статевих клітин на акцептор — Оксиген.

Використання Na₂EDTA свідчить про гальмування вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот у спермі розрідженій «АндроМедом», а у ЛЖГР витрати Оксигену на вказаний процес займають — 1,5 нг-атом О/(хв×0,1 мл С). Таким чином, у розріджених середовищем «АндроМед» еякулятах бугаїв, поряд з нормалізацією активності ланок ланцюга дихання сперміїв, гальмується вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот.

Виявлені відмінності транспорту електронів у ланцюгу дихання мітохондрій сперміїв підтверджуються активністю окисних ферментів. Зокрема, еякуляти розбавлені ЛЖГР, порівняно з «АндроМедом», характеризуються вищою на 65,8 % (p < 0,05) активністю СДГ (табл. 2).

Таблиця 2

Активність окисних ферментів і виживання сперміїв у спермі бугаїв за розрідження середовищами тривалого зберігання еякулятів (n = 10; M ± m)

Активність ферментів дихального ланцюга, од/(год × 0,1 мл С):	Розріджувач	
	ЛЖГР	АндроМед
СДГ	18,1 ± 5,13	6,2 ± 2,63
ЦХО	47,7 ± 9,50	20,8 ± 2,48
Вживання сперміїв при 2–4 °С, год	192,0 ± 17,69	271,2 ± 24,25

Аналогічно, активність ЦХО у спермі, розрідженій ЛЖГР, становить 47,7±9,50 од/(год×0,1 мл С), а «АндроМедом» — нижча на 56,4 % (p < 0,05). Отже, активування СДГ сперміїв за розрідження ЛЖГР еякулятів бугая призводить до посиленого транспорту електронів у ФАД-залежну ланку ланцюга дихання мітохондрій, оминаючи НАД-залежну. Вказаний метаболічний шлях характеризує більш швидкий транспорт електронів до термінальної ланки ланцюга дихання — ЦХО. Тобто, за розрідження сперми ЛЖГР, з одного боку, активування СДГ пришвидшує ресинтез АТФ у сперміях, а з другого, статеві клітини отримують менше на одну молекулу макроерга, оскільки слабше протікає транспорт електронів через НАД-залежну ланку і, відповідно, ресинтез АТФ за її участі. Тому, в умовах ЛЖГР, для поповнення запасів АТФ, статеві клітини повинні проявляти вищу інтенсивність дихання.

Нормалізація активності ланок ланцюга дихання мітохондрій сперміїв у розріджених «АндроМедом» еякулятах, порівняно з ЛЖГР, підвищує збереженість статевих клітин при інкубуванні сперми за температури 2–4 °С. Вживання сперміїв при використанні «АндроМеду» становить 271,2±24, год, а за розрідження ЛЖГР — на 79 год (29,3 %; p<0,05) нижче.

Порівнюючи ефективність використання досліджуваних середовищ розбавлення еякулятів бугаїв перед заморожуванням не виявлено відмінностей в активності спермійв (табл. 3). Після еквілібрування, кріоконсервування та розморожування сперми кількість активних статевих клітин значно знижується в досліджуваних зразках. При цьому, у розріджувачі з вмістом лецитину сої на 24,4 % вища активність спермійв, порівняно з середовищем у склад якого входить яєчний жовток. Аналогічно відрізняється кількість спермійв з прямолінійним поступальним рухом, яких на 8,0 % більше при використанні «АндроМеду», ніж ЛЖГР.

Таблиця 3

Якість розмороженої сперми бугаїв залежно від складу розріджувача

Показники якості сперми, %	До заморожування		Після розморожування	
	ЛЖГР	АндроМед	ЛЖГР	АндроМед
Активність спермійв	86,24±2,34	86,24±2,34	46,67±3,78	58,05±2,23
Спермійв з прямолінійно поступальним рухом	82,53±2,83	82,53±2,83	36,76±3,01	44,73±2,75
Спермійв з маневрним рухом	8,66±0,36	8,66±0,36	21,14±1,19	12,18±0,27
Нерухомих спермійв	13,76±0,21	13,76±0,21	53,33±1,46	41,95±1,33

Обернена залежність виявлена за кількістю спермійв з маневрним рухом та нерухомих спермійв, яких, відповідно, на 9,0 і 11,4 % менше при використанні середовища з вмістом лецитину сої, порівняно з ЛЖГР. Отже, розріджувач, який містить лецитин сої у своєму складі, характеризується кращими кріопротекторними властивостями, що забезпечує вищу збереженість спермійв у процесах технологічної підготовки еякулятів бугаїв до заморожування і розморожування сперми, порівняно з таким, що містить жовток яєць курей.

Після розморожування спермодоз рухливість спермійв впродовж 5 годин інкубування знижується у ЛЖГР та «АндроМеді» (рис.). Однак, у спермі, розбавленій середовищем «АндроМед», статеві клітини характеризуються вищою рухливістю, порівняно зі спермою розбавленою ЛЖГР.

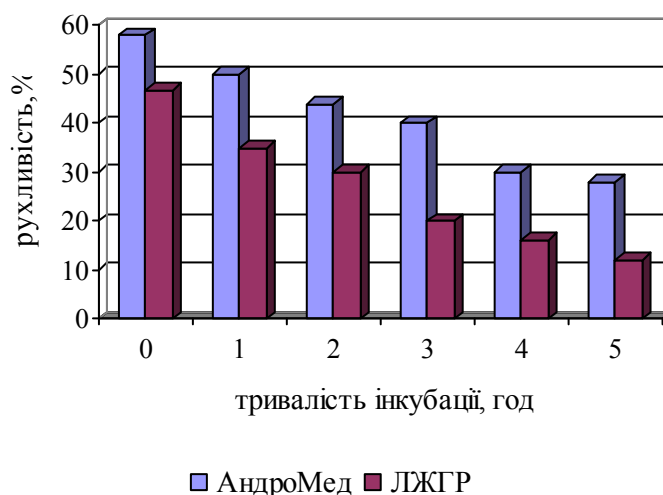


Рис. Рухливість спермійв упродовж п'яти годин інкубування за температури 38 °С

При цьому, у розрідженій «АндроМедом» спермі, після 5 годин інкубування, рухливість спермійв на 12,1 % вища, порівняно з ЛЖГР. Різниця в рухливості спермійв у двох досліджуваних розріджувачах становила 55,8 % і була статистично вірогідною ($p < 0,001$).

Отже, середовище розрідження еякулятів бугаїв «АндроМед», виготовлене з використанням лецитину сої, порівняно з ЛЖГР, нормалізує окисні процеси у спермі та статевих клітинах, що забезпечує високу стійкість спермій до процесів зберігання, еквілібрування, заморожування і розморожування сперми та їх виживання поза організмом бугая. Оскільки між тривалістю виживання поза організмом самця та запліднювальною здатністю спермій існує позитивна кореляція [11], можна стверджувати, що використання спермодоз розрідженої «АндроМедом» сперми бугаїв у практиці штучного осіменіння забезпечить вищу заплідненість телиць і корів.

Висновки

1. У сперміях, за розрідження «АндроМедом» еякулятів бугаїв, нормалізується активність ланок ланцюга дихання мітохондрій та окисних ферментів, що підвищує збереженість статевих клітин при інкубуванні за температури 2–4 °С, порівняно з ЛЖГР.

2. Використання середовища з вмістом лецитину сої забезпечує вищу на 11,3 % активність спермій розмороженої сперми, порівняно з розріджувачем у склад якого входив яєчний жовток.

3. Застосування лецитину сої у складі розріджувача підвищує на 12,1 % активність спермій розмороженої сперми після п'яти годин інкубування, порівняно з використанням середовища з жовтком яєць курей.

Перспективи подальших досліджень. Збереження біологічної повноцінності і підвищення запліднювальної здатності спермій після технологічної обробки сперми (кріоконсервації та розморожування) є актуальним для розроблення покращених варіантів середовищ для розбавлення і тривалого зберігання сперми плідників.

*A. B. Andrushko, N. M. Sharan, I. M. Jaremchuk, A.R. Korbetskyy,
A. P. Panich, I. S. Atamaniuk*

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE USE BULL SEMEN DILUENTS ON EGG YOLKS AND SOYA LECITINE FOR CRYOCONSERVATION

S u m m a r y

The physiological and biochemical characteristics of bull sperm by using diluents with chicken egg yolk and soy lecithin during the process of semen freezing were studied. It was revealed, that dilution of bull ejaculates with «Andromed» media showed better activity of mitochondrial respiratory chain links and oxidative enzymes and increased viability of sperm cells during incubation at 2–4 °C, compared to lactose-yolk-glycerol diluents. After cryopreservation with medium containing soybean lecithin, activity of thawed spermatozoa was higher by 11,3 % compared to diluent with egg yolk. The use of soy lecithin in the diluents increases activity sperm of thawed by 12,1 % after five hours of incubation, compared to medium with chicken egg yolk.

*А. Б. Андрушко, Н. М. Шаран, И. М. Яремчук, А. Р. Корбецкий,
А. П. Панич, И. С. Атаманюк*

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗБАВИТЕЛЕЙ НА ЯИЧНОМ ЖЕЛТКЕ И СОЕВОМ ЛЕЦИТИНЕ ДЛЯ КРИОКОСЕРВАЦИИ

А н н о т а ц и я

Изучали физиолого-биохимические характеристики сперматозоидов быков за использование разбавителей с желтком яиц кур и лецитином сои в процессе технологической обработки спермы. Установлено, что в сперматозоидах, за разрежения средой «Андромед», нормализуется активность звеньев цепи дыхания митохондрий и окислительных ферментов и повышается сохранность половых клеток при инкубации при температуре 2–4 °С, по сравнению с лактозо-желточно-глицериновым разбавителем (ЛЖГР). После криоконсервирования в среде с содержанием лецитина сои, активность сперматозоидов размороженной спермы на 11,3 % выше по сравнению с разбавителем в состав которого входит яичный желток. Использование лецитина сои в составе разбавителя повышает на 12,1 % активность сперматозоидов размороженной спермы после пяти часов инкубации, по сравнению со средой с желтком куриных яиц.

1. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук. — Кишнев : Штиница, 1991. — 197 с.
2. ДСТУ 3535-97. Сперма бугаїв нативна. Технічні умови.
3. Патент України № 10894. Середовище для розбавлення і заморожування сперми бугаїв. — Публ. 29.12.99, Бюл. № 8. — 12 с.
4. *Burkman L. J.* The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential / L. J. Burkman, C. C. Coddington, D. R. Franken // *Fertil. Steril.* — 1988. — 49. — P. 688–97.
5. *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. denDaas // *Theriogenology.* — 2000. — 54. — P. 57–67.
6. *Пакенас П. И.* Байсогальская технология криоконсервирования семени быков / П. И. Пакенас // *Животноводство.* — 1985. — № 1. — С. 16–18.
7. *Осташко Ф. И.* Харьковская технология криоконсервации спермы животных / Ф. И. Осташко, М. П. Павленко, Г. Н. Кузнецов // *Теор. и прикл. аспекты биотехнологии.* — 1991. — С. 32–33.
8. *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. 213–26.
9. Патент України №13369. Спосіб оцінки якості сперми. — Публ. 28.02.97, Бюл. № 1. — 8 с.
10. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / за редакцією В. В. Влізло. — Львів : СПОЛОМ, 2012. — 761 с.
11. *Яблонський В. А.* Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, В. І. Завірюха. — Львів : ТзОВ ВФ Афіша, 2009. — 218 с.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії, доктор ветеринарних наук, с. н. с. Остапів Д. Д.