

УДК: 598.244.1:612.616

## ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ СПЕРМИ ТА ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ ЗА ДОДАВАННЯ ТАУРИНУ В РОЗРІДЖЕНІ ЕЯКУЛЯТИ БУГАЯ

Р. Д. Остапів<sup>1,2</sup>, В. В. Манько<sup>1</sup>, І. М. Яремчук<sup>3</sup>, Д. Д. Остапів<sup>3</sup>  
Oddost@ukr.net

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4; м. Львів, 79005, Україна

<sup>2</sup>Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів  
та кормових добавок, вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

<sup>3</sup>Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38; м. Львів, 79034, Україна

*Вивчали дихальну активність сперми і виживання сперміїв за різних концентрацій таурину в розріджених еякулятах бугая. Інтенсивність поглинання кисню спермою визначали полярографічно з використанням електрода Кларка (при температурі 38,5 °С), виживання сперміїв — за зберігання розбавленої сперми (при температурі 0–4° С) до припинення прямолінійного поступального руху. До розрідженої сперми фосфатно-сольовим буфером та синтетичними середовищами (лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем та «АндроМед») додавали таурин у концентраціях 0,175, 0,35, 0,525 та 0,7 ммоль/л. Дослідженнями встановлена залежність між інтенсивністю дихання сперми бугая і виживанням сперміїв за використання різних середовищ розрідження та під впливом таурину у різних концентраціях. Збільшення концентрації таурину в розріджених еякулятах бугая знижує інтенсивність дихання сперми. Найбільш виражене зменшення швидкості поглинання кисню виявлено після розрідження еякулятів фосфатно-сольовим буфером, найнижче — за розбавлення середовищем «АндроМед». За розрідження сперми бугая фосфатно-сольовим буфером виживання статевих клітин підвищується зі збільшенням концентрації таурину. При розбавленні еякулятів бугая лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем, залежність виживання сперміїв від вмісту таурину характеризувалась максимальною величиною за додавання 0,35 ммоль/л. Розрідження еякулятів середовищем «АндроМед» виживання сперміїв із збільшенням концентрації таурину зменшувалося. При цьому величина фізіологічного показника за концентрації 0,7 ммоль/л знизилась на 18,2 % порівняно з контролем. Можливою причиною позитивного впливу таурину на виживання статевих клітин є здатність підтримувати трансмембранний потенціал мітохондрій і впливати на утилізацію субстратів, його антиоксидантні властивості або, за негативного ефекту, здатність котранспортуватися у клітину з іонами Na<sup>+</sup>.*

**Ключові слова:** ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ, ТАУРИН, ВИЖИВАННЯ СПЕРМІЇВ, СПЕРМА, БУГАЙ

## SPERM RESPIRATION INTENSITY AND SURVIVAL OF SPERMATOZOA WITH TAURINE ADDITION IN DILUTED BULL EJACULATES

R. D. Ostapiv<sup>1,2</sup>, V. V. Manko<sup>1</sup>, I. M. Yaremchuk<sup>3</sup>, D. D. Ostapiv<sup>3</sup>  
Oddost@ukr.net

<sup>1</sup>Ivan Franko national university of Lviv, st. Grushevskogo, 4, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup>State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Donetsk st., 11, Lviv, 79019, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Animal Biology NAAS, st. V. Stus 38, Lviv, 79034, Ukraine

*Semen respiration intensity and spermatozoa survival by using diluents with different taurine concentration in bull ejaculates was studied. Intensity of oxygen consumption by semen was determined polarographically with Clark electrode usage (at temperature 38.5 °C), spermatozoa survival — by storage with dilution (at temperature 0–4° C) till linear forward motion is stopped (h). To diluted semen, with*

phosphate-saline buffer and synthetic mediums (lactose-yolk-glycerin diluent and «Andromed») taurine in concentrations 0.175; 0.35; 0.525 and 0.7 mmol/l was added. In our studies we determined correlation between semen respiration rate and spermatozoa survival, with using diluents and at action of taurine in different concentrations. With taurine concentration increasing, sperm respiration intensity decreased. The biggest decrease of indexes was after diluting semen with phosphate-saline buffer and the smallest — after mixing with Andromed. By diluting semen with phosphate-saline buffer, survival increases with taurine concentration. When bull ejaculates were diluted by lactose-yolk-glycerin diluents spermatozoa survival dependence had a maximal index with addition 0.35 mmol/l, though changes haven't reached first degree of probability. In case of sperm dilution by Andromed, spermatozoa survival decreased with taurine concentration increase, and while adding 0.7 mmol/l, was lower on 18.2 % comparing to control. Possible reason for positive taurine impact on spermatozoa survival is ability to maintain transmembrane mitochondrial potential and influence on substrate utilization, its antioxidant properties, in case of negative effect — ability to cotransport with  $\text{Na}^+$ , that decreases spermatozoa motility.

**Keywords:** RESPIRATION INTENSITY, TAURINE, SPERMATOZOA SURVIVAL, SEMEN, BULL

### ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ СПЕРМЫ И ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ТАУРИНА В РАЗБАВЛЕННЫЕ ЭЯКУЛЯТЫ БЫКА

Р. Д. Остапів<sup>1,2</sup>, В. В. Манько<sup>1</sup>, И. М. Яремчук<sup>3</sup>, Д. Д. Остапів<sup>3</sup>  
Oddost@ukr.net

<sup>1</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франка,  
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

<sup>3</sup>Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина

Изучали дыхательную активность спермы и выживание спермиев при разных концентрациях таурина в разбавленных эякулятах быка. Интенсивность поглощения кислорода спермой определяли полярографически с использованием электрода Кларка (при температуре 38,5°C), выживание спермиев — при сохранении разбавленной спермы (при температуре 0–4°C) до прекращения прямолинейного поступательного движения. К разбавленной сперме фосфатно-солевым буфером и синтетическими средами (лактозо-желточно-глицериновым разбавителем и «АндроМед») добавляли таурин в концентрациях 0,175, 0,35, 0,525 та 0,7 ммоль/л. Установлена связь между интенсивностью дыхания спермы быка и выживанием спермы при использовании разных сред разбавления и разных концентраций таурина. Увеличение концентрации таурина в разбавленных эякулятах быка снижает интенсивность дыхания спермы. Наиболее выраженное уменьшение скорости потребления кислорода регистрировали, после разбавления эякулятов фосфатно-солевым буфером, наименьшее — при разбавлении средой «АндроМед». При разбавлении спермы быка фосфатно-солевым буфером выживание половых клеток повышается с увеличением концентрации таурина. При разбавлении эякулятов быка лактозо-желточно-глицериновым разбавителем, зависимость выживания спермиев от концентрации таурина характеризовалась максимальной величиной при добавлении 0,35 ммоль/л. После разбавления средой «АндроМед» выживание спермиев с увеличением концентрации таурина уменьшалось. При этом величина физиологического показателя при концентрации 0,7 ммоль/л была ниже на 18,2 % по сравнению с контролем. Возможно, положительное влияние таурина на выживаемость половых клеток связано со способностью поддерживать потенциал митохондрий и влиять на утилизацию субстратов, его антиоксидантные свойства или, при отрицательном эффекте, котранспортируются в клетку с ионами  $\text{Na}^+$ .

**Ключевые слова:** ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЫХАНИЯ, ТАУРИН, ВЫЖИВАНИЕ СПЕРМИЕВ, СПЕРМА, БЫК

Таурин — похідна сірковмісних амінокислот: метіоніну та цистеїну, яка у великих концентраціях присутня у мітохондріях, цитоплазмі та міжклітинному просторі. У клітині сполука регулює осмотичний тиск [1], концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , володіє антиоксидантними властивостями та впливає на ресинтез АТФ мітохондріями [2].

Таурин відіграє важливу роль в метаболізмі спермій і його вплив на якість статевих клітин залежить від вмісту вказаної сполуки у спермі [3]. Так, за внесення 0,5 ммоль/л він захищає спермії шимпанзе від оксидативного стресу, додавання 0,5–1,5 ммоль/л підвищує рухливість [4], а за 1 ммоль/л — гальмує осмотичне набухання статевих клітин кнурів і бугаїв. Ймовірно, таурин взаємодіє з цитоплазматичною аденілатциклазою та підвищує цитозольну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , що стимулює рухливість спермій [5]. Крім того, таурин взаємодіє з першим комплексом ланцюга дихання і підвищує трансмембранний потенціал мітохондрій нейроглії [6]. Проте, за мілімолярних концентрацій таурин проявляє прооксидантну дію, що характеризується підвищенням вмісту малонового діальдегіду у сперміях [7, 8]. Проникнення великої кількості таурину в клітину супроводжується котранспортом іонів  $\text{Na}^+$ , що спричиняє втрату рухливості спермій [9].

Мета досліджень — вивчити вплив таурину на дихальну активність сперми та виживання спермій за розрідження еякулятів бугая.

### Матеріали і методи

Дослідження проведені на базі Львівського національного університету імені Івана Франка, Інституту біології тварин НААН та Львівського науково-виробничого центру «Західплемресурси». Для досліджень використовували свіжоотримані еякуляти бугаїв. У спермі вивчали дихальну активність та виживання спермій. Інтенсивність поглинання кисню спермою (нг-атом О / 0,1 мл сперми × хв) визначали полярографічно з використанням

електрода Кларка, вмонтованого у термостатовану комірку (38,5 °С) об'ємом 1 мл, з автоматичною реєстрацією перебігу процесу. Виживання спермій (год) досліджували при зберіганні за 0–4° С розбавленої сперми до припинення прямолінійного поступального руху.

З метою виявлення впливу таурину на дихальну активність сперми і виживання спермій еякуляти ділили на частини і розріджували: фосфатно-сольовим буфером (ФСБ;  $\text{NaCl}$  — 0,8 г,  $\text{KCl}$  — 0,02 г,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,11 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,02 г,  $\text{MgCl}_2$  — 0,01 г на 100 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ) та синтетичними середовищами — лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем (ЛЖГР) та «АндроМед». До сперми, розрідженої вказаними середовищами, додавали таурин у дозах, які відповідають десятій (0,175 ммоль/л), п'ятій (0,35), четвертій (0,525) і другій (0,7) частинам від його концентрації в нативній спермі бугая. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М. О. Плохінським (1970) з використанням комп'ютера та програмного забезпечення Clipper [10].

### Результати й обговорення

За розрідження середовищем ЛЖГР дихальна активність сперми становить —  $39,60 \pm 2,55$  нг-атом О / (0,1 мл сперми × хв), нижча на 17,6 % ( $P < 0,05$ ) — у випадку використання ФСБ і ще нижча, на 53,0 % ( $P < 0,01$ ) — коли розбавляли середовищем «АндроМед». При цьому, тривалість виживання спермій збільшувалась зі зміною складу, присутності та підвищення концентрацій субстратів окиснення у середовищах розрідження (від ФСБ до «АндроМед»), однак вірогідна різниця не встановлена (табл. 1).

Додавання таурину у наростаючих концентраціях до сперми, розрідженої ФСБ, знижує дихальну активність (табл. 2). Так, внаслідок додавання 0,35 ммоль/л таурину інтенсивність дихання зменшується на 27,9 % ( $P < 0,05$ ), а за 0,525 ммоль/л — на 32,8 % ( $P < 0,01$ ), порівняно з контролем.

Таблиця 1

**Дихальна активність сперми та виживання спермій у розріджених еякулятах бугая (M±m)**

Показник	Середовище		
	ФСБ (n = 5)	ЛЖГР (n = 5)	«АндроМед» (n = 10)
Дихальна активність сперми, нг-атом O / (0,1 мл сперми × хв)	24,40±1,94*	39,60±2,55	18,60±2,15**
Вживання спермій за 0–4 °С, год	105,60±8,59	120,00±11,76	132,00±14,70

*Примітка:* \* — різниця статистично вірогідна порівняно до максимального значення з P<0,05;  
\*\* — з P<0,01

За максимальної концентрації таурину (0,7 ммоль/л) дихальна активність сперми знижується на 44,3 % (P<0,001). Кореляційне відношення ( $\eta^2$ ) між

дихальною активністю сперми, розрідженої ФСБ, та вмістом таурину середньої сили і становить 0,647.

Таблиця 2

**Дихальна активність сперми і виживання спермій за додавання таурину в розріджені ФСБ еякуляти бугая (n = 5; M±m)**

Умови досліджу	Споживання кисню, нг-атом O / (0,1 мл сперми × хв)	Вживання спермій за температури 0–4°С, год
Контроль	24,4±1,94	105,6±8,59
Таурину, 0,175 ммоль/л	20,0±1,26	124,8±8,03
0,35 ммоль/л	17,6±1,04*	124,8±12,52
0,525 ммоль/л	16,4±1,31**	124,8±12,52
0,7 ммоль/л	13,6±0,67***	129,6±8,59*
$\eta^2$	0,647	0,118
F	9,159	0,068

*Примітка:* \* – різниця статистично вірогідна порівняно до контролю з P<0,05;  
\*\* – з P<0,01; \*\*\* – з P<0,001

Додавання таурину у наростаючих концентраціях до розрідженої сперми ФСБ підвищує виживання спермій. Правда, за 0,175–0,525 ммоль/л таурину ці зміни не досягають (у кожному окремому випадку) першого рівня вірогідності. За додавання максимальної концентрації таурину (0,7 ммоль/л) виживання спермій, порівняно з контролем, було вищим на 18,5 % (P<0,05). Кореляційне відношення ( $\eta^2$ ) між виживанням спермій бугая за розрідження у ФСБ та вмістом таурину — слабе. Дихальна активність сперми за розрідження середовищем ЛЖГР внаслідок додавання таурину знижується дещо менше (табл. 3).

У контрольних пробах та за додавання 0,175–0,525 ммоль/л таурину споживання кисню коливається у межах похибки середнього арифметичного. За максимальної концентрації (0,7 ммоль/л) — на 27,3 % (P<0,05) знижувалось.

Кореляційне відношення між інтенсивністю дихання сперми бугая за розрідження у ЛЖГР та вмістом таурину середньої сили і становить 0,342.

Величина виживання спермій за умови внесення 0,175 та 0,35 ммоль/л таурину в розріджувач ЛЖГР проявляє тенденцію до збільшення. Однак, додавання 0,525 та 0,7 ммоль/л таурину величина досліджуваного показнику повертається до контрольних значень. Кореляційне відношення між виживанням спермій за розрідження ЛЖГР та вмістом таурину — слабе.

На відміну від наведених результатів, додавання таурину до сперми бугая, розріджену середовищем «АндроМед», слабо впливало на дихальну активність (табл. 4). У контрольних зразках та за додавання 0,175 ммоль/л таурину дихальна активність вірогідно не відрізняється.

Таблиця 3

**Дихальна активність сперми і виживання спермійів за додавання таурину в розріджені ЛЖГР еякуляти бугая (n = 5; M±m)**

Умови досліджу	Споживання кисню, нг-атом О / (0,1 мл сперми × хв)	Вживання спермійів за температури 0–4°C, год
Контроль	39,6±2,55	120,0±11,76
Таурину, 0,175 ммоль/л	39,2±2,01	134,4±8,59
0,35 ммоль/л	38,4±2,49	134,4±12,88
0,525 ммоль/л	35,2±2,30	129,6±10,95
0,7 ммоль/л	28,8±3,03*	120,0±11,76
η <sup>2</sup>	0,342	0,062
F	2,598	0,333

Примітка: \* — різниця статистично вірогідна порівняно до контролю з P<0,05

Однак, коли вносили 0,35 та 0,525 ммоль/л діючої речовини інтенсивність дихання сперми знижується, відповідно, на 11,9 та 21,5 % (P<0,05). За максимальної концентрації таурину (0,7 ммоль/л) досліджуваний показник зменшується на

27,4 % (P<0,05). Кореляційне відношення (η<sup>2</sup>) між концентрацією таурину та дихальною активністю сперми, розрідженої середовищем «АндроМед», слабе і становить — 0,094.

Таблиця 4

**Дихальна активність сперми і виживання спермійів за додавання таурину в розріджувач «АндроМед» (n = 10; M±m)**

Умови досліджу	Споживання кисню, нг-атом О / (0,1 мл сперми × хв)	Вживання спермійів за температури 0–4°C, год
Контроль	18,6±2,15	132±14,70
Таурину, 0,175 ммоль/л	18,2±2,07	132±12,33
0,35 ммоль/л	16,4±1,64*	112±12,22
0,525 ммоль/л	14,6±1,86*	128±16,65
0,7 ммоль/л	13,5±1,94*	108±9,38*
η <sup>2</sup>	0,094	0,087
F	1,174	0,607

Примітка: \* — різниця статистично вірогідна порівняно до контролю з P<0,05

Вживання спермійів у середовищі «АндроМед» за підвищення вмісту таурину зменшується, хоча статистично вірогідним, це зниження є лише за концентрації таурину 0,7 ммоль/л — на 18,2 % (P<0,05). Кореляційне відношення між вмістом таурину та виживанням спермійів у середовищі «АндроМед» — слабе.

Із результатів досліджень випливає, що додавання до еякулятів таурину у наростаючих концентраціях (0,175, 0,35, 0,525 та 0,7 ммоль/л), не залежно від субстратів окиснення в розріджувачах, знижує інтенсивність дихання сперми. Ймовірно, зниження споживання кисню зумовлено властивостями таурину — гальмуванням процесів вільнорадикального окиснення як компонентів плазми сперми і розріджувачів, так і мембранних структур статевих клітин [7]. Однак, як свідчать

результати досліджень, роль таурину в окисному метаболізмі сперми (спермійів) неоднозначна і залежить від концентрації вказаної сполуки та складу розріджувачів. При цьому, найбільше зниження споживання кисню за зростаючої концентрації таурину встановлено в еякулятах, розріджених ФСБ. Ймовірно, це зумовлено тим, що таурин здатний підвищувати трансмембранний потенціал мітохондрій, а це, своєю чергою, забезпечує баланс між процесами споживання кисню та ресинтезом АТФ [6]. Тому, зі збільшенням концентрації таурину підвищується виживання спермійів.

Ступінь зниження дихання під впливом таурину за розрідження середовищами ЛЖГР та «АндроМед» є нижчим, ніж ФСБ. Очевидно, що це зумовлено кількістю і співвідношенням

субстратів окиснення у середовищах. Таким чином, у ЛЖГР інтенсивніше відбуваються процеси використання цукрів гліколізом [11] з одночасним гальмуванням вільнорадикального окиснення, ніж за розрідження середовищем «АндроМед». Тому, виживання спермій залишається на рівні контролю тільки за низьких концентрацій таурину (0,175 і 0,35 ммоль/л), а за високих (більше 0,35 ммоль/л) величина показника знижується.

Зважаючи на вказане, можна припустити, що у сперміях за оптимальних доз таурину нормалізується інтенсивність обмінних процесів [1]. Негативний вплив високих доз таурину зумовлений його здатністю котранспортуватись з іонами  $\text{Na}^+$  у клітину, що призводить до зниження рухливості спермій [9]. Крім цього, підвищення концентрації таурину у середовищах «АндроМед» та ЛЖГР може зумовлювати зниження рівня окиснення і використання субстратів та модулювати активність лактатдегідрогенази [6].

### Висновки

1. Дихальна активність сперми бугаїв за розрідження фосфатно-сольовим буфером становить  $24,40 \pm 1,94$ ; лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем —  $39,60 \pm 2,55$ ; «АндроМед» —  $18,60 \pm 2,15$  нг атом  $\text{O} / (0,1 \text{ мл сперми} \times \text{хв})$ , а виживання спермій за температури 2–4 °С, відповідно —  $105,60 \pm 8,59$ ;  $120,00 \pm 11,76$ ;  $132,00 \pm 14,70$  год.

2. Додавання до розріджених еякулятів бугая таурину у наростаючих концентраціях (0,175, 0,35, 0,525 та 0,7 ммоль/л) знижує інтенсивність дихання сперми. Найбільш виражені зміни величини досліджуваного показника виявили за розрідження сперми бугая фосфатно-сольовим буфером, а найменші — за розбавлення середовищем «АндроМед».

3. За розрідження сперми бугая фосфатно-сольовим буфером виживання спермій підвищується зі збільшенням концентрації таурину. За розбавлення сперми бугая лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем фізіологічний показник якості статевих клітин проявляє криволінійну залежність з максимальною

величиною за 0,35 ммоль/л таурину. За розрідження еякулятів середовищем «АндроМед» виявлено зниження виживання спермій за 0,7 ммоль/л таурину.

**Перспективи подальших досліджень.** Оцінити вплив різних доз таурину на обмінні процеси організму тварин.

1. De la Puerta C., Arrieta F. J., Balsa J. A., Botella-Carretero J. I., Zamarrón I., Vázquez C. Taurine and glucose metabolism: a review. *Nutr. Hosp.* 2010. Vol. 25. P. 350–368.

2. Huxtable R. J. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 1992. Vol. 72. P. 101–160.

3. Yablonskiy V. A., Homin S. P., Zaviruha V. I. Biotechnologichni i molekularno-genetichni osnovi vidtvorennya tvarin [Biotechnological and molecular-genetic basis of animal reproduction]. Lviv, TzOV VF Afisha, 2009. 218 s. (In Ukrainian).

4. Aitken R. J., Clarkson J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1987. Vol. 81. P. 459–469.

5. Blondin P., Coenen K., Sirard M. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.* 1997. Vol. 18. P. 454–460.

6. O'Byrne M. B., Tipton K. F Taurine-induced attenuation of MPP1 neurotoxicity in vitro: a possible role for the GABAA subclass of GABA receptors. *J. Neurochem.* 2000. Vol. 74. P. 2087–2093.

7. Alvarez J. G., Storey B. T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 1983. Vol. 29. P. 548–555.

8. Wagtendouk A. M., Haring R. M., Kaal-Lansbergen L. M., Dendaas J. H. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology.* 2000. Vol. 54. P. 57–67.

9. Torres-Flores V., Picaz o-Juarez G., Hernandez -Rueda Y., Darszon A., Gonzalez-Martinez M. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Human Reproduction.* 2011. Vol. 26 (No. 10). P. 2626–2635.

10. Plohinskiy N.A. Byometryya [Biometrics]. Moscow, MHU, 1970, pp. 358 (in Russian).

11. Ribeiro R. A., Bonfleur M. L., Amaral A. G., Vanzela E. C., Rocco S. A., Boschero A. C., Carneiro E. M. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2009. Vol. 25 (4). P. 370–379.