

ВПЛИВ ШВИДКОСТІ ОХОЛОДЖЕННЯ У ДІАПАЗОНІ ВІД +15 °С ДО +5 °С НА ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ СПЕРМІЇВ КНУРІВ ПІСЛЯ РОЗМОРОЖУВАННЯ

А. Р. Корбецький, провідний фахівець, *О. О. Корбецька*, к. с.-г. н., м. н. с.
korbetska.olya@inenbiol.com.ua
Інститут біології тварин НААН

Спермії кнурів чутливі до низьких температур та до холодового шоку і це негативно впливає як на виживаність сперміїв так і на їх запліднювальну здатність. На початку процесу заморожування перші ушкодження виникають у результаті швидкого охолодження за зміни температури, при якій сперма була еякульована, до температури нижче 15 °С і, особливо, якщо охолодження триває до 0 °С. Це призводить до того, що спермії, крім здатності до руху, зменшують метаболічну активність через втрату внутрішньоклітинних ферментів і протеїнів, а також перерозподіл іонів між клітинами та оточуючим середовищем, втрачається життєздатність значної кількості сперміїв, виникають морфологічні зміни. Метою роботи є вивчення впливу швидкості охолодження сперміїв кнурів у діапазоні від +15 °С до +5 °С на їх якісні показники після розморожування.

Сперму для досліджень відбирали мануальним методом від 6 клінічно здорових статевозрілих кнурів віком 2–5 років, живою масою 200–340 кг, порід — велика біла (2), п'єтрен (1), ландрас (2), гемпшир (1) у ЛНВЦ «Західплемресурси». Сперму від кнурів-плідників відбирали раз на тиждень. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом, активністю та концентрацією сперміїв. Сперму відбирали та обробляли відповідно до контрольного протоколу технології кріоконсервування сперми кнурів. Контрольна швидкість охолодження під час проведення досліду в діапазоні від +15 °С до +5 °С — 0,05 °С/хв. Контрольоване зниження температури для дослідження було забезпечено за допомогою програмного заморожувача клітин Cell Freezer R204 (Planer, Великобританія), в якому крім функції охолодження передбачене нагрівання, що дозволяє контролювано знижувати температуру в «плюсовому» діапазоні. Дослідними швидкостями охолодження були підвищені швидкості в 5, 10, 20 та 40 разів відносно контрольної, що відповідно становило: 0,25, 0,5, 1,0 та 2,0 °С/хв. Після розморожування визначали активність сперміїв, цілісність плазматичних мембран (ЦПМ, за активністю лактатдегідрогенази); функціональність плазматичних мембран сперміїв (за тестом гіпоосмотичного набрякання сперміїв (ТГНС)), збереженість акросом (ЗА) сперміїв (за активністю акрозину). Статистичний аналіз результатів дослідження здійснювали за допомогою пакета прикладного програмного забезпечення Statistica 8.0 (Statsoft, США).

Активність сперміїв після розморожування у відповідних групах за швидкості від 0,05 до 1 °С/хв вірогідно не відрізнялась, хоча спостерігалась тенденція до зниження значення цього показника із збільшенням швидкості охолодження. Найвищою активність сперміїв була за швидкості охолодження 0,05 °С/хв, та найнижчою — за 1 °С/хв. Хоча між ними не спостерігалось вірогідної різниці, однак, за швидкості охолодження 1 °С/хв активність сперміїв після розморожування була на 6,5 % нижчою порівняно з дослідними зразками сперми. Слід зазначити, що середні показники активності у зразках сперміїв, охолоджених з швидкістю 0,05, 0,25, та 0,5 °С/хв практично не відрізнялись. Використання швидкості охолодження 2 °С/хв проявило негативний вплив на активність сперміїв, яка була на 19,2 % нижчою ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Збільшення швидкості охолодження від 1 до 2 °С/хв у діапазоні від +15 до +5 °С призвело до зниження активності на 13,6 %, хоч різниця була невірогідна ($p > 0,05$). Цілісність плазматичних мембран сперміїв після розморожування за різних швидкостей охолодження суттєво не відрізнялася, крім швидкості охолодження 2 °С/хв, яка негативно вплинула на плазматичні мембрани сперміїв. Цей показник становив у середньому 45,8 %, що на 22,5 % ($p < 0,01$) нижче порівняно з контролем. Досліджуючи функціональність плазматичних мембран сперміїв (ТГНС), встановлено найвищий середній показник за швидкості охолодження 0,25 °С/хв (58,1 %) та найнижчий — за 2 °С/хв (51,5 %), проте різниця між ними невірогідна. Очевидно, така розбіжність отриманих даних пов'язана з високою чутливістю оцінки цілісності плазматичних мембран за визначенням активності лактатдегідрогенази в екстрацелюлярному просторі, при якому вихід ЛДГ у середовище із сперміїв відбувається на початкових стадіях ушкодження плазматичної мембрани в результаті дії зниження температур. Кількість сперміїв з неушкодженою акросомою за швидкості охолодження від 0,05 до 1 °С/хв як і інші показники, описані перед цим, вірогідно не відрізнялись між собою. Однак, після розморожування швидкість охолодження 2 °С/хв проявила свій негативний вплив на збереженість акросом, що виражалось у вірогідно ($p < 0,01$) нижчій кількості сперміїв з неушкодженою акросомою, ніж у контролі (0,05 °С/хв). Водночас виживаність сперміїв у зразках, що були заморожені із швидкістю 0,05, 0,25, 0,5 та 1 °С/хв вірогідно не відрізнялись між собою, що свідчить про певну ступінь толерантності сперміїв кнурів до дещо підвищеної швидкості охолодження у досліджуваному температурному діапазоні. Однак, швидкість охолодження понад 1 °С/хв призводить до вірогідно вищих ушкоджень сперміїв і відповідно їхньої запліднювальної здатності після розморожування.

Таким чином, використання більшої швидкості охолодження (1 °С/хв) у температурному діапазоні від +15 до +5 °С не змінило показників якості сперми кнурів після розморожування порівняно із контролем (0,05 °С/хв), що вказує на можливість застосування її, знизивши при цьому тривалість технологічної обробки сперми для кріоконсервування з 180 до 10 хв.