

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СПЕРМИ КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ ЗА ВВЕДЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН В СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ЗАМОРОЖУВАННЯ*О. Б. Андрушко, к.б.н., с.н.с., a.andrushko@inenbiol.com.ua*

Інститут біології тварин НААН

Можливість довготривалого зберігання сперми кнурів-плідників шляхом глибокого заморожування залишається перспективним напрямком у галузі свинарства при організації племінної роботи для штучного осіменіння. Штучне осіменіння тварин передбачає створення «банку» кріоконсервованих репродуктивних клітин. Відомо, що у процесі кріоконсервації у деякої частини спермій відбуваються порушення їхньої структури, а пошкодження плазматичної мембрани спермія супроводжується витоком ферментів, які приймають участь у процесі запліднення. Також має місце ушкодження мітохондрій. У результаті процесу заморожування-відтавання знижуються енергетично-обмінні процеси, що послаблюють рухливість спермій. За низькотемпературного заморожування сперми тварин розбавлення її у відповідних синтетичних середовищах зменшує руйнівну дію температурних коливань на живі клітини.

Метою проведених досліджень було вивчення необхідності перебування спермій у середовищі, яке сприятиме відновленню можливих кріопшкоджень після впливу на них фізико-хімічних чинників, що виникають внаслідок глибокого заморожування. Причини втрати запліднюючої здатності спермій кнурів у біотехнологічних процесах кріоконсервування з'ясовували при уведенні у склад середовища синтетичного препарату, що належить до групи органічних тіолів — унітіолу, який містить майже 29 % вільних SH груп, що є найбільш реакційно спроможними серед інших груп, підтримують нативну структуру білків та взаємодіють з ендогенними гонадотропінами, білками та коферментами різних класів (особливо пептидних, таких як глутатіон). У попередніх дослідженнях з'ясовано, що глюкоза та сахароза у складі середовищ для заморожування сперми кнурів володіють кращою мембрано протекторною дією у порівнянні з іншими вуглеводами. На цій підставі вивчали комбінацію даних цукрів з добавками унітіолу у дозах: 2,8; 3,5 та 4,5 мкл/100мл (відповідно — 1, 2, 3 дослідні групи) порівняно до контрольного середовища ВІТ.

Сперму для досліджень відбирали мануальним методом від трьох кнурів породи ландрас віком 3-4 роки у ЛНВЦ «Західплемресурси». Свіжоотримані еякуляти другої фракції оцінювали за об'ємом, активністю та концентрацією. Заморожували еякуляти концентрацією не менше 200 млн/мл і активністю 70 % з кількістю патологічних форм не більше 15 % спермій. Еквілібрацію проводили при 5°C протягом 120 хв. Заморожування сперми здійснювали у соломинках 0,5 мл на програмному заморожувачі з перенесенням у рідкий азот (-196°C). Розморожували сперму у водяній бані при 50°C. На всіх етапах заморожування сперми та після її деконсервації брали зразки спермій для мікроскопії.

Встановлено, що додаткове введення унітіолу до складу дослідних середовищ у вищезазначених дозах на етапах розбавлення сперми кнурів не спричинило суттєвих відмінностей за показниками рухливості спермій у порівнянні з контрольним середовищем. Аналогічна закономірність спостерігалась у подальших технологічних маніпуляціях із спермою кнурів при підготовці її до глибокого заморожування. Після еквілібрації рухливість спермій у досліджуваних зразках дещо відрізнялась і коливалась від 87,0 до 82,1 %. Проте після розморожування сперми кнурів у дослідних групах встановлено значну різницю цього показника, який знижувався і становив 40,3 % у контрольній групі та 63,4 % у першій дослідній групі. Таким чином, кращі результати отримані при додаванні до середовища унітіолу в дозі 2,8 мкл/100мл. Вживаність спермій після деконсервації за використання середовищ з добавками унітіолу у дозах 2,8; 3,5 і 4,5 мкл/100мл становила відповідно 6,3; 6,0; 5,5 годин проти 5 годин у контрольному зразку.

Як тест пошкодження цитоплазматичних і мітохондріальних мембран у процесах технологічних маніпуляцій із спермою кнурів у процесі заморожування-відтавання визначали активність маркерних ферментів, дефундованих із клітин на різних етапах кріоконсервації. Встановлено, що після розбавлення сперми у всіх досліджуваних зразках середовищ змінюється активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) та кислої фосфатази (КФ). Це свідчить про негативний вплив розбавлення сперми кнурів. Етап еквілібрації сперми не спричиняв змін у мітохондріях гамет, а величина даного показника не відрізнялась від таких, які були після розбавлення сперми. Значні зміни спостерігались після деконсервації сперми кнурів — активність АсАТ зростала у всіх групах, а суттєвий вихід цього ензиму зі спермій у середовище відбувався у контрольному, другому та третьому дослідних зразках. Розбавлення сперми середовищами з добавками унітіолу спричинило однаковий вихід КФ за винятком спермій, які були розбавленні контрольним середовищем, де активність цього ферменту була у два рази вищою порівняно з іншими досліджуваними зразками ще на початковому етапі. Після деконсервації сперми зростала активність КФ у контрольному та третьому дослідному зразках середовища. Отже ці середовища володіють найнижчим захисним ефектом на спермі кнура на різних етапах кріоконсервації сперми. У дослідних зразках середовищ для заморожування сперми кнурів, у склад яких додатково вводили унітіол у дозі 2,8 мкл/100мл підвищується активність спермій після відтавання та продовжується їх виживання. Менший відсоток спермій з різними ушкодженнями вказує на кращу мембрано протекторну дію у першому дослідному середовищі у порівнянні з іншими.