

## **ВПЛИВ ДОДАВАННЯ ОКСИТОЦИНУ ДО КРІОПРОТЕКТОРНОГО РОЗЧИНУ НА ФІЗІОЛОГІЧНІ І МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ СПЕРМИ БАРАНІВ**

**І. В. Лобачова, канд. с.-г. наук,  
Ю. І. Болотов, О. С. Жулінська, І. Г. Михайлова**

Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» – Національний науковий селекційно-генетичний центр з вівчарства

*Додавання окситоцину до кріопротекторного розчину до кінцевої концентрації 0,66 або 1,0 Од в 1 мл розбавленої сперми не впливало негативно на фізіологічні та морфологічні показники спермій баранів, а також їх здатність до глибокого заморожування. Не виявлено позитивного ефекту додавання окситоцину на підвищення запліднюючої здатності розмороженої сперми при осіменінні вівцематок, підданих гормональній стимуляції статевих охоти, у літні і осінні місяці.*

*Ключові слова: баран, сперма, окситоцин, кріоконсервація*

Розробка методики глибокого заморожування сперми дала поштовх посиленню селекційного процесу у тваринництві за рахунок використання сперми лише цінних у генетичному відношенні плідників. Але у вівчарстві впровадження цієї методики не отримало задовільного результату. Причиною останнього був низький показник запліднення вівцематок після осіменіння замороженою спермою. Характерним є те, що зниження фізіологічних показників спермій відбувається при кріоконсервації сперми як баранів, так і інших видів, але здатність просування розморожених спермій статевими шляхами вівцематок значно нижча за такий процес у інших тварин.

На сьогодні для збільшення рівня запліднення вівцематок при використанні кріоконсервованої сперми її вводять безпосередньо у роги матки. Але такий підхід потребує залучення спеціалістів високої кваліфікації, що обмежує коло ймовірних споживачів замороженої сперми.

Одним зі шляхів підвищення ефективності цервікального осіменіння кріоконсервованою спермою на сьогодні може бути прискорення швидкості її просування статевими шляхами самиць. Можли-

вим інструментом досягнення цього є препарати, які збільшують скорочуючу активність шийки матки під час осіменіння. Але існуючі дані щодо впливу цих речовин на показник запліднення вівцематок досить суперечливі. Так за B.L. Sayre і G.S. Lewis [7] внутрішньом'язове введення окситоцину збільшувало тетанію матки і сприяло розширенню шийки, не впливаючи при цьому на запліднення яйцеклітин. J.N. Stellflug et al. [8] повідомляє про зниження показника запліднення вівцематок після обробки окситоцином при лапароскопічному осіменінні. Внутрішньом'язове введення окситоцину перед осіменінням у дослідах S. Salamon і R.J. Lightfoot поліпшувало просування заморожено-розмороженої сперми, про що свідчило збільшення показника запліднення вівцематок. Але при введенні катетера глибоко в шийку матки, показник запліднення, навпаки, знижувався [6].

Дані щодо неоднозначного впливу окситоцину при внутрішньом'язовому введенні, а також те, що він є одним із компонентів сперми ссавців [3], наштовхують на ідею додавання окситоцину до розбавлювачів сперми. За такий спосіб препарат має діяти безпосередньо на м'язи шийки і може застосовуватись у меншій кількості. Проте літературні дані з дослідження такої можливості на вівцях обмежені. Варто відмітити результати І.Д. Коврижних [1], за якими додавання окситоцину до свіжоотриманої розбавленої сперми баранів покращувало її переживаність і запліднюючу здатність. При цьому позитивний ефект спостерігався лише при розбавленні сперміїв глюкозо-цитрато-жовтковим середовищем. Додавання препарату не вплинуло негативно на морфологію і рухливість сперміїв інших видів, зокрема, кнурів [4] і бугаїв [2]. За D.G. Levis [5] додавання препарату до сперми кнурів покращувало показники запліднення проти показників його ін'єкційного введення. Даних щодо дії окситоцину на здатність до заморожування і запліднюючу здатність заморожено-розмороженої сперми баранів ми не знайшли.

Метою роботи було вивчення впливу додавання окситоцину до кріопротекторного середовища на морфологічні та фізіологічні показники, стійкості до заморожування і запліднюючу здатність сперми баранів-плідників.

**Матеріал та методика досліджень.** Досліди проведено на спермі баранів асканійської тонкорунної породи ДПДГ «Асканія-Нова» в умовах фізіологічного двору Інституту у два етапи – у травні-червні і жовтні 2009 року.

Сперму отримували на штучну вагіну, оцінювали за рухливістю, концентрацією і об'ємом. Після цього еякулят ділили навпіл і розбавляли: одну частину - контрольним розбавлювачем (КР), який містив 2,5 г сахарози, 0,2 г сечовини, 1,5 мл глицерину, 5 мл курячого жовтка і 25 мл дистильованої води у співвідношенні 1:2, другу час-

тину еякуляту - у такому самому співвідношенні розбавлювачем КР, у якому частину води замінювали водним розчином окситоцину до кінцевої концентрації останнього у розбавлювачі 1,0 або 1,5 ОД/мл (або 0,66 і 1,0 ОД на мл розбавленої сперми).

Визначення впливу препаратів на фізіологічні параметри здійснювали за показниками переживаності і абсолютної переживаності при температурі  $+38^{\circ}\text{C}$ , активності сперми після розбавлення/адаптації і після розморожування; на морфологічні показники - за кількістю спермійів з пошкодженнями структурних елементів відразу після розбавлення і після 4-годинної витримки при температурі  $+38^{\circ}\text{C}$ .

При визначенні показників переживаності і абсолютної переживаності активність сперми оцінювали візуально кожні 1-2 години до констатації повного зникнення ознак руху спермійів. Пошкодження структурних елементів спермійів тестували під фазово-контрастним мікроскопом при збільшенні  $300\times$ . Враховували дефекти голівки спермійів, перегини тіла і хвоста. До дефектів голівки відносили нерівномірність забарвлення, сторонні включення у ній, часткове сповзання акросоми з голівки спермія або її відсутність. Для визначення здатності до заморожування сперму піддавали кріоконсервації за традиційною технологією відкритих гранул на фторопластовій пластині у парах рідкого азоту. Розморожування сперми проводили шляхом заглиблення гранули у 1 мл 2,9 %-ного розчину цитрату натрію при температурі  $+37-38^{\circ}\text{C}$ .

Запліднюючу здатність сперми визначали двома дослідями за результатами штучного осіменіння розмороженою спермою гормонально стимульованих вівцематок. Для цього у липні вівцематок піддавали дії вагінальних песаріїв з хронолоном (30 мг/пес) протягом 13 діб з наступним виявленням охоти і дворазовим осіменінням. Другий дослід проведено у серпні-вересні, вівцематок при цьому піддавали дії вагінальних песаріїв протягом 13 діб, обробці препаратами ГСЖК (200 ІО/гол) і «Сурфагон» (12,5 ОД/гол) з наступним одноразовим осіменінням через 22-23 години після ін'єкції гонадотропін-релізінг гормону.

Результати досліджень обробляли статистично з обрахуванням рівня вірогідності ( $p$ ) і коефіцієнта Стьюдента ( $t_d$ ).

**Результати досліджень.** За результатами дослідів не виявлено негативної дії додавання препарату окситоцин до кріопротекторного розчину у дозі 1,0 або 1,5 ОД/мл на переживаність і абсолютну переживаність сперми (табл. 1). Навпаки, окситоцин при обох концентраціях збільшував показник абсолютної переживаності проти контрольного показника, що може свідчити про його стимулюючу дію на метаболізм клітин.

**Таблиця 1. Вплив додавання окситоцину до кріопротекторного розчину на фізіологічні показники сперми баранів\***

Тип роз-бав-лювача	Кількість повторів, N	Кількість зразків, n	Пережива-ність, год	Абсолютна пережива-ність, абс. од.
концентрація окситоцину 1,0 Од/мл				
КР з окси-тоцином	4	32	11,375±0,91	59,66±4,84
КР (конт-роль)	4	32	11,25±1,05	58,19±6,09
концентрація окситоцину 1,5 Од/мл				
КР з окси-тоцином	2	13	11,62±1,47	61,79±7,45
КР (конт-роль)	2	13	11,08±1,43	59,09±6,87

Примітка: \* - різниця між показниками груп невірогідна.

Додавання окситоцину у дозі 1,0 Од/мл не призвело до збільшення частки сперміїв з порушеннями структурних елементів проти показників середовища без нього (табл. 2). Підвищення концентрації препарату у середовищі до 1,5 Од/мл невірогідно ( $t_d=1,63$ ) збільшувало кількість клітин з порушеннями голівки. Слід відмітити, що у першому досліді зростання кількості сперміїв з пошкодженнями голівки було більшим у середовищі без окситоцину, чого не виявлено у другому досліді. Можливо це пояснюється часом їх проведення. Так, перший дослід з використанням концентрації окситоцину 1,0 Од/мл проведено у травні-червні, коли природна статева активність овець знижена, тоді як вплив концентрації 1,5 Од/мл вивчався у жовтні, при її максимумі. Сезонне посилення метаболічних процесів могло бути однією з причин зростання пошкоджуючої дії міотропної речовини.

Вивчення впливу препарату на здатність сперми до заморожування проведено лише для концентрації 1,0 Од/мл (табл. 3). Результати досліді не виявили суттєвого впливу окситоцину на показник активності сперми після розморожування, що свідчить про відсутність негативного впливу препарату на здатність сперми баранів до глибокого заморожування.

Отже, додавання окситоцину до кріопротекторного розчину не веде до підвищення негативного впливу останнього на фізіологічні і морфологічні показники сперми баранів.

**Таблиця 2. Вплив додавання окситоцину до кріопротекторного розчину на морфологічні показники сперми**

Тип сперми	Кількість повторів, N	Кількість зразків, n	% спермійів з порушеннями		
			головки	тіла	хвоста
концентрація окситоцину 1,0 Од/мл					
розбавлена КР і витримана 4 год	1	7	12,77± 3,67	12,82± 2,60	19,29± 1,87
розбавлена КР з окситоцином і витримана 4 год	1	7	11,80± 2,26	13,07± 3,01	21,47± 2,49
нативна (контроль)	1	7	7,93± 1,68	27,53± 3,26	23,84± 1,93
концентрація окситоцину 1,5 Од/мл					
розбавлена КР і витримана 4 год	2	13	8,1± 1,56	7,11± 2,60	4,67± 1,06
розбавлена КР з окситоцином і витримана 4 год	2	13	13,54± 2,95	10,06± 2,47	6,02± 1,30
нативна (контроль)	2	13	8,49± 2,73	9,46± 1,92	3,70±0 ,89

**Таблиця 3. Вплив додавання окситоцину у дозі 1 Од/мл до контрольного середовища на здатність сперми до заморожування**

Тип розбавлювача	Кількість повторів, N	Кількість зразків, n	Активність сперми, бал		
			при отриманні	після адаптації	після розморожування
КР з окситоцином	3	13	7,85± 0,23	7,12± 0,09	3,45± 0,12
КР (контроль)	3	13	7,85± 0,23	7,05± 0,05	3,53± 0,11

За результатами ягніння ефективність використання замороженої сперми в обидва періоди була низькою (табл. 4). На нашу думку, однією з основних причин цього могла бути незадовільна підготовка тварин. Так з 46 підданих у літній період гормональної стимуляції вівцематок реагувало статевою охотою лише 18. Низький рівень реагування міг супроводжуватися незадовільною підготовкою статевих шляхів тих тварин, які проявили статеву охоту, і низькою якістю овульованих яйцеклітин. Можна також припустити, що чутливість тварин до окситоцину у цей період була знижена.

**Таблиця 4. Ефективність використання сперми, замороженої з або без додавання окситоцину, при штучному осіменінні гормонально стимульованих вівцематок**

Тип використаної сперми	Піддано осіменінню, n	Активність сперми, бал	Ягнилось, n (%)	Багатоплідність, %
термін проведення дослідів - липень				
заморожена з окситоцином	6	3,41±0,14	0 (0,0)	0,0
заморожена без окситоцину	12	3,37±0,21	1 (8,3)	100,0
термін проведення дослідів - серпень-вересень				
заморожена з окситоцином	9	3,44±0,16	1 (11,1)	100,0
заморожена без окситоцину	10	3,35±0,22	1 (10,0)	100,0
нативна (контроль)	7	7,71±0,2	5 (71,4)	120,0

В осінньому досліді у 10-ти із 19 стимульованих тварин при візуальному огляді спостерігали почервоніння передвір'я і піхви, у 8-ми – порожевіння. Наступну охоту фіксували не раніше ніж після 16-ої доби після осіменіння. Це водночас свідчило про стимуляцію статевої охоти у більшій частині тварин. Як контроль при цьому використані вівцематки, які прийшли в стан охоти спонтанно і яких одночасно з дослідними осіменяли свіжоотриманою спермою того самого барана, щоб виключити можливий вплив факторів «часу» і «оператора». Рівень запліднення контрольних тварин достатньо високий – 71,4 %. Тож, можна припустити, що іншою причиною зниження рівня запліднення вівцематок могла виступати низька якість

розмороженої сперми.

Різниця за запліднюючою здатністю сперми, замороженої з або без додавання окситоцину, не виявлено. Проте для остаточного ствердження доцільності прийому додавання окситоцину до кріопротекторного розчину необхідно повторити досліди з залученням при осіменінні вівцематок, які прийшли в стан статевого збудження природно.

**Висновки.** Додавання окситоцину до кріопротекторного розчину не впливає негативно на фізіологічні та морфологічні показники сперми баранів, а також її здатність до глибокого заморожування.

Питання доцільності додавання окситоцину до кріопротекторного розчину для підвищення запліднюючої здатності розмороженої сперми баранів потребує додаткового вивчення.

### Список використаної літератури

1. Коврижных И.Д. Влияние окситоцина на оплодотворяемость овцематок / И.Д. Коврижных // Генетика, разведение и содержание сельскохозяйственных животных: науч. конф., 1977 г.: мат. конф. – Київ: Наукова думка. – 1978. – С. 131-132.

2. Fuchs U. The action of oxytocin on sperm motility. In vitro experiments with bull spermatozoa / U. Fuchs, C. Leipnitz, T.H. Lippert // Clin. Exp. Obstet. Gynecol. – 1989. – Т. 16, № 4. – С. 95-97.

3. Goverde H.J.M. A neuropeptide in human semen : Oxytocin / H.J.M. Goverde, J.G.A. Bisseling, A.M.M. Wetzels, D.D.M. Braat, G.J. Pesman, F.C.G.J. Sweep, E.J.H. Meuleman // Systems Biology in Reproductive Medicine. – 1998. - Т. 41, № 1. – С. 17–22.

4. Hüseyin B.C. In vitro effect of oxytocin on the duration of sperm motility and morphology / B.C. Hüseyin // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2005. – Т. 4, № 9. – С. 794-797.

5. Levis D.G. The effect of oxytocin at the time of insemination on reproductive performance. A review / D.G. Levis // University of Nebraska – Lincoln, Animal Science Department, Nebraska Swine Reports, 2000. - <http://digitalcommons.unl.edu/coopext/swine/114>.

6. Salamon S. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing / S. Salamon, R.J. Lightfoot // J. Repr. Fert.. – 1970. – Т. 22. – С. 409-423.

7. Sayre B. L. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes / B. L. Sayre, G. S. Lewis // Theriogenology. - 1997. – Т. 48, № 2. – С. 267-275.

8. Stellflug J.N. Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination / J.N. Stellflug, M.C. Wulster-Radcliffe, E.L. Hensley, E.A. Cowardin, R.C. Seals, G.S. Lewis // J. Anim. Sci. - 2001. – Т. 79. – С. 568-573.