

УДК: 636.2:591.463.1.

**Кава С.Й., Дмитрів О.Я., Кудла І.М., Остапів Д.Д., Яремчук І.М. ©***Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С.З. Гжицького***ЗАПЛІДНЮВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ ПРИ  
ДОДАВАННІ У РОЗРІДЖУВАЧ ЕЯКУЛЯТІВ АНТИОКСИДАНТІВ**

*Вивчали вплив антиоксидантів у розріджувачі еякулятів на виживання і запліднювальну здатність спермій бугаїв. Встановлено, що відновлена форма глутатіону у складі розріджувача еякулятів стимулює активність сукцинатдегідрогенази у свіжоотриманій розбавленій та інкубованій спермі, а аскорбінова кислота знижує активність ферменту у свіжоотриманій спермі, а у інкубованій 24 год - при концентрації 5,0 мМ. Поєднання відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти у розріджувачі сперми в концентраціях, відповідно, 2,5+1,25 мМ стимулює активність сукцинатдегідрогенази та виживання спермій на 18,5 %, підвищує запліднювальну здатність спермій на 11,7 %.*

**Ключові слова:** антиоксиданти, активність сукцинатдегідрогенази, виживання спермій, запліднювальна здатність, сперма, бугай.

Для інтенсивного відтворення поголів'я великої рогатої важливе значення має розроблення способів забезпечення високої життєздатності статевих клітин. Вказані вимоги зумовлені тим, що при підготовці до заморожування та після розморожування сперми порушується метаболізм спермій. Виявлено, що технологічні операції супроводжуються активуванням мембранозв'язаних ферментів та інтенсивним вільнорадикальним окисненням жирних кислот, що руйнує ліпопротеїнові комплекси й мембрани статевих клітин, знижує резистентність та рухливість спермій і, їх головну функцію – запліднювальну здатність [1]. Запобігають неконтрольованим процесам окиснення присутні в еякулятах природні антиоксиданти (відновлена форма глутатіону, аскорбінова кислота, вітамін Е та ін.) та ферменти антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, каталаза). Проте, в процесі технологічної підготовки сперми до кріоконсервації, антиоксидантний захист послаблюється, а окремі його ланки втрачаються. Дефіцит сполук з антиоксидантними властивостями поповнюють шляхом їх додаванням у розріджувачі еякулятів та середовища для розморожування сперми [2,3,4].

Мета роботи - вивчити вплив антиоксидантів у розріджувачі еякулятів на виживання і запліднювальну здатність спермій бугаїв.

**Матеріали і методи.** Дослідження проведені у лабораторії кафедри акушерства і штучного осіменіння сільськогосподарських тварин імені Г. В. Звереві Львівського національного університету ветеринарної медицини та

біотехнологій імені С.З. Гжицького і Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Досліджували сперму бугаїв віком від 3 до 10 років, яку отримували на штучну вагіну з режимом використання бугаїв дуплетна садка два рази на тиждень, через дві доби. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), густотою під мікроскопом (в роздавленій краплі) і активністю (рухливістю) сперміїв (бали). Визначали: концентрацію сперміїв за допомогою фотоелектроколориметра ( $10^9$  клітин/мл;  $10^9$ /мл), виживання при температурі  $+2 - +4^\circ\text{C}$  до припинення прямолінійного поступального руху (год.) у спермі свіжоотриманій та розрідженій лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем (ЛЖГР); активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) з використанням 2,3,5-трифенілтетразолію і натрію сукцинату. Активність ферменту виражали в умовних одиницях екстинкції (од/(год  $\cdot$  0,1 мл сперми; С) [5]. В розріджену сперму вносили відновлену форму глутатіону (Г-SH) та аскорбінову кислоту (АА) в концентраціях 1,25, 2,5, 5,0 мМ, а також у поєднанні, після встановлення оптимальних доз.

Для вивчення запліднювальної здатності сперміїв еякуляти розділяли на частини - контрольну (без антиоксидантів) і дослідну (з антиоксидантами у поєднанні Г-SH+АА - 2,5+1,25 мМ). Еякуляти розбавляли ЛЖГР згідно з інструкцією. З піддослідних корів сформували дві групи аналогів за віком (3 - 8 років), перебігом родів (нормальні) і післяродового періоду (до 30 днів): контрольна (40 гол.) і дослідна (30 гол.). Осіменіння проводили ректо-цервікальним методом за наявності феноменів тички і охоти. Заплідненість корів визначали після першого осіменіння за відсутністю статевих циклів протягом 60 - 90 днів після осіменіння, в сумнівних випадках – ректальним дослідженням. Статистичний аналіз отриманого цифрового матеріалу проведено за М. О. Плохінським (1969)[6]. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Результати досліджень.** Еякуляти піддослідних бугаїв характеризуються об'ємом  $4,3 \pm 0,18$  мл (лім 2,0 – 8,0 мл), концентрацією сперміїв  $1,09 \pm 0,11 \times 10^9$ /мл (лім  $0,4 - 1,60 \times 10^9$ /мл), активністю –  $7,4 \pm 0,16$  бали (лім 2,0 – 8,0 бали), виживанням -  $110,5 \pm 5,70$  год. (лім 48 – 240 год), активністю СДГ  $24,7 \pm 2,79$  од/(год  $\cdot$  0,1 мл С; лім 0 – 70,0 од/(год  $\cdot$  0,1 мл С).

Вивченням впливу відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти, їх поєднання у розріджувачі еякулятів бугаїв на СДГ доведено, що в спермі бугаїв через 24 год інкубування активність ферменту підвищується на 81,4% (табл.). Додавання до розріджувача Г-SH в концентраціях 1,25, 2,5 та 5,0 мМ стимулює у свіжоотриманій розбавленій спермі активність СДГ, відповідно, у 2,1, 2,7 та 5,2 рази ( $p < 0,05$ ). Через 24 год інкубування різниця між контрольними та дослідними пробами менша і становить 42,5%, 2,0 та 2,5 рази.

Подібні зміни виявлені при додаванні до свіжоотриманої розбавленої сперми АА. Однак, наростаючі дози вказаного антиоксиданта в складі розріджувача знижують активність СДГ, порівняно до контролю, на 7,6, 37,8% та майже у 5 разів. Інкубування розрідженої сперми протягом 24 год. з

додаванням АА в концентрації 1,25 та 2,5 мМ майже не впливає на активність СДГ, яка становить  $20,5 \pm 5,04$  -  $27,8 \pm 4,32$  од/(год  $\cdot$  0,1 мл С), а при 5,0 мМ знижується у 2,7 рази, порівняно до контролю.

Таблиця

**Вплив антиоксидантів на активність сукцинатдегідрогенази у розрідженій спермі бугаїв, n=8; M $\pm$ m**

Умови досліджу	Активність ферменту в спермі, од/(год $\cdot$ 0,1 мл С):	
	свіжоотриманій	інкубованій 24 год
Контроль (ЛЖГР)	$11,3 \pm 4,27$	$20,5 \pm 5,04$
Дослід: ЛЖГР		
+ Г-SH (мМ): 1,25	$24,3 \pm 9,24$	$29,3 \pm 5,84$
2,5	$31,0 \pm 7,66^*$	$42,3 \pm 6,80^*$
5,0	$59,2 \pm 13,39^*$	$50,8 \pm 4,32^{***}$
АА (мМ): 1,25	$10,5 \pm 4,98$	$27,8 \pm 4,32$
2,5	$8,2 \pm 4,18$	$22,1 \pm 7,45$
5,0	$2,3 \pm 0,77$	$7,3 \pm 3,66$
Г-SH + АА 2,5+1,25	$29,8 \pm 4,97^*$	$36,7 \pm 6,54$

\* Різниця статистично вірогідна, порівняно до контролю. ( $p < 0,05$  та  $0,001$ ).

Поєднання Г-SH+АА в концентраціях 2,5+1,25 мМ у свіжоотриманій спермі, забезпечує підвищення активності СДГ у 2,6 рази ( $p < 0,05$ ), а в інкубованій протягом 24 год - стимулює активність СДГ на 79,0%.

Про вплив антиоксидантів на життєздатність сперміїв свідчить їх виживання, яке при розбавленні ЛЖГР і зберіганні сперми при +2 - +4°C становить -  $127,4 \pm 11,33$  год., а з додаванням антиоксидантів - Г-SH+АА в концентрації, відповідно, 2,5+1,25 мМ -  $156,3 \pm 14,56$  год, що вище на 18,5%.

Результати вивчення активності окисних ферментів та виживання сперміїв за дії поєднання Г-SH і АА у розріджувачі еякулятів, підтверджуються осіменінням корів. Так, від використання сперми з антиоксидантами Г-SH+АА 2,5+1,25 мМ із 30 корів запліднилися після першого осіменіння 20 гол., що становить 66,7%. В контрольній групі із 40 гол. запліднилися 21 гол. - 55,0%, різниця - 11,7%.

**Висновки.**

1. Відновлена форма глутатіону у складі розріджувача еякулятів стимулює активність сукцинатдегідрогенази у свіжоотриманій розбавленій та інкубованій спермі.

2. Аскорбінова кислота у розріджувачі еякулятів бугаїв знижує активність сукцинатдегідрогенази у свіжоотриманій спермі, а у інкубованій 24 год при концентраціях 1,25 та 2,5 мМ - майже не змінюється ( $20,5 \pm 5,04$  -  $27,8 \pm 4,32$  од/(год  $\cdot$  0,1 мл С) і знижується у 2,7 рази при 5,0 мМ.

3. Поєднання відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти у розріджувачі сперми в концентраціях, відповідно, 2,5+1,25 мМ стимулює активність сукцинатдегідрогенази та виживання сперміїв на 18,5 %.

4. Сумісне використання в розріджувачі для сперми бугая відновленої форми глутатіону і аскорбінової кислоти в концентраціях, відповідно, 2,5 мМ і

1,25 мМ підвищує запліднювальну здатність сперміїв на 11,7 %.

#### Література

1. Jones R., Mann T., Sherins R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma // *Fertil. Steril.* -1979. -V.31. –P. 531–537.

2. Slaweta R., Liaskowska T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen sperm // *Anim. Reprod. Sci.* –1987. –V.13., №4. –P. 249– 253.

3. Donnelly E. T., McClure N. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa // *Mutagenesis.* – 1999. - V. 14., № 5. - 505-512.

4. Шаран М.М. Підвищення ефективності штучного осіменіння корів і телиць. - Львів, 2009. – 38 с.

5. Чухрій Б.М., Клевець Л.О. До методики визначення активності окислювальних ферментів у спермі бугаїв // *Розведення та штучне осіменіння великої рогатої худоби.* – Київ, 1978. – Вип. 10. – С. 42–45.

6. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников. М.: Колос., 1969. -255с.

#### Summary

Kava S, et all.

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology  
name after. S. Z. Gzhicky Lviv, Ukraine*

#### FERTILIZING CAPACITY OF BULL'S SPERMATOZOA BY ADDING ANTIOXIDANTS IN EJACULATE DILUENT

*The impact of antioxidants in the ejaculate diluent on survival and fertilizing capacity of bull's spermatozoa was studied. It was found that reduced form of glutathione in the ejaculate diluent stimulates the activity of succinate dehydrogenase in just obtained, diluted and incubated sperm, ascorbic acid lowers activity of enzyme in freshly obtained sperm, and in incubated by 24 h. – at concentration 5mM. Combining reduced form of glutathione and ascorbic acid in sperm diluent in concentration, respectively, 2,5+1,25 мМ stimulates activity of succinate dehydrogenase and survival of bull's spermatozoa on 18,5 %, it increases fertilizing capacity of bull's spermatozoa on 11,7 %.*

*Стаття надійшла до редакції 17.09.2010*