

УДК 636.2:591.463.1–57.086.13

Шаран М. М., д.с.-г.н. (mm_sharan@yahoo.com)[©]**Яремчук І. М.**, к.с.-г.н.

Інститут біології тварин НААН України, м. Львів

Шаловило С. Г., д.с.-г.н., професорЛьвівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького

ЕФЕКТИВНІСТЬ КРІОПРОТЕКТОРІВ РОСЛИННОГО І ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ СПЕРМИ БУГАЇВ ПЛІДНИКІВ

Досліджено ефективність кріопротекторів рослинного і тваринного походження при заморожуванні сперми бугаїв-плідників. Встановлено, що використання середовища, яке містило соєвий лецитин, як кріопротектор підвищило активність розмороженої сперми на 11,3 % порівняно з середовищем, у склад якого входили фосфоліпіди яєчного жовтка. Застосування кріопротектора рослинного походження підвищує активність спермій після п'яти годин інкубації на 12,1 %, порівняно з використанням тваринних компонентів.

Ключові слова: середовище, виживання, бугаї-плідники, спермії, кріозахисні речовини, антиоксиданти

Вступ. Сучасна міжнародна індустрія тваринництва базується на застосуванні штучного осіменіння з використанням замороженої, а в подальшому розмороженої сперми і, відповідно, використання розбавників, які реально підходять для процесу її заморожування. Першим етапом роботи при низькотемпературному заморожуванні сперми тварин є її розбавлення. Ефективність заморожування сперми в значній мірі залежить від складу синтетичних середовищ, які використовують для її розбавлення. Ці середовища повинні вміщувати в собі речовини, які здатні забезпечувати зберігання біологічної повноцінності спермій у процесі їх технологічної обробки [1, 2, 5]. Крім того, вони повинні створити оптимальні для спермій умови рН, осмотичного тиску, електропровідності і буферності.

На основі морфологічних, біохімічних і фізіологічних досліджень сперми запропоновані нові підходи до підбору компонентів для розробки захисних середовищ на основі стабілізації стійкості білково-ліпідних комплексів, активності глутаміно-шавлевої трансамінази та акросоми [3, 4, 8, 9].

Крім гліцерину, в якості кріозахисної речовини, основними компонентами розбавників, які використовують при заморожуванні сперми, є кілька цукрів — як функціональних джерел енергії, а також інші речовини, які підтримують осмолярність і забезпечують буферну здатність.

У традиційних розбавниках курячий жовток діє як джерело ліпопротеїдів, типу фосфоліпідів, і інших високомолекулярних речовин, які допомагають

попередити низькотемпературний шок. Яєчний жовток успішно використовується на протязі десятиліть [6, 7].

Хоча існує нове покоління розчинників сперми, які вільні від компонентів тваринного походження, на сьогоднішній день розчинники, які містять жовток курячого жовтка широко використовують для кріоконсервування сперми [10, 11].

Метою даного дослідження було порівняння базового розчинника на яєчному жовтку, яке використовується для заморожування сперми в необлицьованих гранулах і соломинках із одним з розчинників, який не містить білка тваринного походження.

Матеріали і методи. Впродовж одного місяця від трьох бугаїв голштинської породи отримували еякуляти сперми на штучну вагіну з режимом використання дуплетна садка два рази на тиждень, через дві доби. Для досліджень брали лише високоякісні еякуляти сперми, у яких було не менше 80 % живих спермійів з концентрацією не менше 0,7 млрд. спермійів в 1мл. Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), густиною і активністю (рухливістю) спермійів (%) під мікроскопом (в роздавненій краплі).

Визначали концентрацію спермійів за допомогою фотометра та їх виживання до припинення прямолінійного поступального руху (год.) у свіжоотриманій та розбавленій спермі, витримуючи у термостаті при температурі 38°C. Кожен еякулят розділяли на дві частини. Одну частину еякуляту розбавляли лактозо-жовтковим середовищем (ЛЖС), іншу — розчинником, який не містить білків тваринного походження і чий кріопротекторні властивості основані на соєвому лецитині (Андромед). Кінцева концентрація спермійів 15 млн. спермійів у дозі. Після розбавлення сперма була фасована у пайети і поставлена на 2,5 год. на еквілібрацію при температурі -4°C. Замороження проводили на процесорі німецької фірми Minitub у парах рідкого азоту при температурі -120 °C.

Розморожували сперму у водяній бані при температурі 38 °C впродовж 25 сек. Аналіз рухливості кожного зразка проводили безпосередньо після розморожування та на протязі 1, 2, 3, 4, 5-ти год. інкубації при температурі 38°C.

Під мікроскопом Olympus (Японія) при збільшенні у 200 разів проводили аналіз рухливості спермійів за допомогою програми Spermvision (Німеччина).

Отримані результати статистично обробляли за допомогою програми Microsoft Office Excel

Результати дослідження. Порівнюючи ефективність використання двох різних середовищ для розбавлення сперми бугаїв не виявлено відмінностей в активності спермійів до заморожування (табл.).

Рухливість живих спермійів після розморожування визначали використовуючи машинний аналіз руху кожної клітини (спермія). В результаті кріоконсервації сперми кількість активних спермійів після розморожування значно знизилася, причому використання середовища, яке містило соєвий лецитин, як кріопротектор, активність була на 24,4 % вищою порівняно з середовищем, у склад якого входили фосфоліпіди яєчного жовтка.

Таблиця

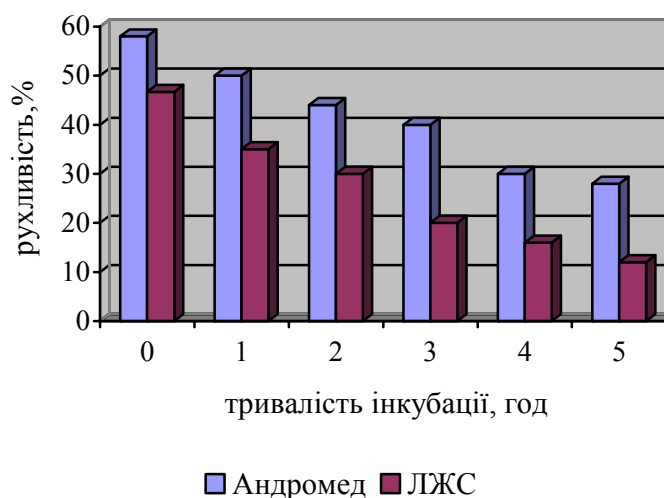
Життєздатність сперми бугаїв-плідників залежно від складу розбавника

Показники, %	До заморожування		Після розморожування	
	Андромед	ЛЖС	Андромед	ЛЖС
Активність (рухли-вість) спермій	86,24±2,34	86,24±2,34	58,05±2,23	46,67±3,78
Спермій з прямоліній-но поступальним рухом	82,53±2,83	82,53±2,83	44,73±2,75	36,76±3,01
Спермій з манежним рухом	8,66±0,36	8,66±0,36	12,18±0,27	21,14±1,19
Нерухомих спермій	13,76±0,21	13,76±0,21	41,95±1,33	53,33±1,46

Аналогічними були і кількість спермій із прямолінійно поступальним рухом. Зокрема, після розморожування відсоток спермій з прямолінійно поступальним рухом при використанні «Андромеду» був на 21,7 % вищим, ніж при застосуванні ЛЖС.

Обернена залежність спостерігалася за кількістю спермій з манежним рухом та нерухомих спермій. Так, відсоток спермій з манежним рухом при використанні соєвого лецитину у складі середовища був нижчим 42,4 %, а нерухомих спермій — на 21,3 %, порівняно із застосуванням фосфоліпідів яєчного жовтка.

Для об'єктивності оцінки якості сперми після розморожування ми провели її інкубацію впродовж п'яти годин (рис.).

**Рис. Параметри руху сперми впродовж досліджуваного часу**

Рухливість спермій значно зменшилась із часом в еякулятах розбавлених ЛЖС. Після 5-ти годин інкубації їх рухливість була 16,76±0,87 %, в той час як спермії, піддані кріоконсервації з Андромедом проявляють незначне зниження рухливості 28,84±1,31 %. Сперма розбавлена середовищем «Андромед» проявляє на протязі усього досліджуваного часу значно вищу рухливість у порівнянні із спермою, розбавленою ЛЖС. Різниця в рухливості спермій у двох досліджуваних розчинниках була статистично суттєва.

Використання розчинників, у склад яких входить жовток курячого яйця вимагає не тільки великої роботи з його підготовки та очищення, а також вносить суттєвий неконтрольований ризик забруднення бактеріями, лікарськими препаратами, гормонально активними речовинами, які здатні погіршити не тільки активність сперми після розморожування але й запліднюючу здатність сперматозоїдів.

Таким чином, результати досліджень вказують на необхідність використання розчинників для сперми з відповідним складом і вільними від патогенних організмів заміниками яєчного жовтка, який би забезпечував оптимальні показники запліднення тварин та простоту обробки в лабораторних умовах.

Висновки.

1. Використання середовища, яке містило соєвий лецитин, як кріопротектор підвищило активність розмороженої сперми на 11,3 % порівняно з середовищем, у склад якого входили фосфоліпіди яєчного жовтка.

2. Застосування кріопротектора рослинного походження підвищує активність спермій після п'яти годин інкубації на 12,1 %, порівняно з використанням тваринних компонентів

Література

1. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации // Кишинев. — „Штиинца“. — 1991. — 197 с.
2. ДСТУ 3535 — 97 // Сперма бугаїв нативна. Технічні умови.
3. Пакенас П.Й. Байсогальская технология криоконсервирования семени быков // Животноводство. — 1985. — № 1. — С.16–18.
4. Осташко Ф.И. Харьковская технология криоконсервации спермы животных /Ф.И. Осташко, М.П. Павленко, Г.Н. Кузнецов // Теор. и прикл. аспекты биотехнол. — К., — 1991. — С.32–33.
5. Патент України №10894 // Середовище для розбавлення і заморожування сперми бугаїв. — Публ. 29.12.99. — Бюл. № 8.
6. Патент України №13369 // Спосіб оцінки якості сперми. — Публ. 28.02.97. — Бюл. №1.
7. van Wagtendonk-de Leeuw A.M. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. / A.M. van Wagtendonk-de Leeuw, R.M. Haring, L.M. Kaal-Lansbergen, J.H. den Daas. // Theriogenology —2000. — 54. — P. 57–67.
8. Cross N.L. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. / N.L. Cross, P. Morales, J.W. Overstreet, F.W. Hanson // Gamete Res 1986. — 15. — P. 213–26.
9. Burkman L.J. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. /L.J. Burkman, C.C. Coddington, D.R. Franken, T.F. Krugen, Z. Rosenwaks, G.D. Hogen // Fertil Steril 1988. — 49. — P. 688–97.

10. Hinsch K.D. In vitro tests for essential sperm functions using the phytoestrogen genistein as a test substance. //K.D. Hinsch, V. Aires, W. Hägele, E. Hinsch // Andrologia 2000. — 32. — P. 225–231.

11. Zhang B.R. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AIprogramme. /B.R. Zhang, B. Larsson, N. Lundeheim, M.G. Haard, H. Rodriguez-Martinez // Int J. Androl — 1999.—22. — P. 253–260.

Summary

M. Sharan, I. Yaremchuk S. Shalowylo

EFFICIENCY OF CRYOPROTECTANTS VEGETABLE AND ANIMAL ORIGIN AT FREEZING OF BULLS SPERM

Investigated the efficiency of cryoprotectants vegetable and animal origin at freezing of sperm bull. Found that use of the environment that contain soy lecithin as cryoprotectants increased activity of defrosted sperm by 11,3 % compared with the medium consisting of egg yolk phospholipids. The use of cryoprotectants vegetable increases the activity of sperm after five hours of incubation by 12,1 % compared with the use of animal components.

Рецензент – д.вет.н., проф. Стефаник В.Ю.