

УДК 636.4:591.463.1; 595.787

Горчин С. В., аспірант, **Шаран М. М.**, доктор сільськогосподарських наук,
Яремчук І. М., кандидат сільськогосподарських наук ©
Інститут біології тварин НААН, м. Львів

ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СПЕРМІЇВ КНУРІВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОФІЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ ЛЯЛЕЧОК ДУБОВОГО ШОВКОПРЯДА У СКЛАДІ РОЗРІДЖУВАЧА СПЕРМИ

Наведено результати досліджень якості сперміїв впродовж 5 днів інкубування in vitro за використання водного екстракту лялечок дубового шовкопряда у складі середовища для розбавлення сперми кнурів. Встановлено, що гідрофільний екстракт лялечок дубового шовкопряда у концентрації 2,5, 3,75 і 5 % у складі розріджувача «Екосперм В» забезпечує високу активність сперміїв кнурів впродовж інкубування in vitro. На п'ятий день відсоток активних і прогресивно активних сперміїв у дослідній пробі, де до середовища було додано 2,5 %-й розчин лялечок дубового шовкопряда, був найвищим - відповідно 62,6 і 68,5 %, що на 9,9 і 12,5 % вище порівняно з контролем.

Ключові слова: кнур, сперма, гідрофільний екстракт лялечок дубового шовкопряда, розріджувач.

Вступ. При технологічній обробці сперми, розбавленні її синтетичними середовищами, охолодженні та зберіганні в охолодженому стані відбуваються значні структурні і біологічні ушкодження сперміїв, що значно знижує їх фертильність. Тому актуальним завданням є застосування сучасних технологічних розробок для створення середовищ, які сприяють підвищенню біологічної повноцінності сперми тварин. Перспективним є розроблення синтетичних середовищ для сперми кнурів, що дозволяє підтримувати високу біологічну повноцінність сперміїв при зберіганні в охолодженому стані до 17 °С протягом п'яти днів. Проте взяття, розбавлення, транспортування і зберігання розрідженої сперми кнурів пов'язані з охолодженням сперміїв, порівняно з температурою, в якій вони перебували до еякуляції [1].

Однією з причин зниження фертильності охолодженої сперми кнурів вважають активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів. У зв'язку з цим проводяться дослідження з підвищення захисних властивостей розріджувачів введенням до їх складу різних натуральних або синтетичних антиоксидантів, а також інших біологічно активних речовин. Отримано позитивні результати з використання бичачого сироваткового альбуміну і тіолових сполук [4] та етилового спирту [5] як антиоксидантів у складі розріджувачів сперми кнурів. Проте і далі проводиться пошук нових ефективніших антиоксидантних сполук для розріджувачів сперми кнурів.

Особливої уваги заслуговує біологічно активний препарат «Антерин-ТАД», виготовлений на основі гідрофільного екстракту лялечок дубового шовкопряда і який містить велику кількість амінокислот, вітамінів та мінеральних елементів, що зумовлює максимальну біологічну активність і, зокрема, антиоксидантну [6, 7]. Речовини екстракту з лялечок дубового шовкопряда спроможні нормалізувати процеси, які проходять всередині клітини, можуть замінювати або доповнювати деякі компоненти поживних середовищ для тваринних клітин або одноклітинних організмів. Застосування 3–4 %-го екстракту лялечок шовкопряда [8] забезпечує продовження живучості деконсервованих спермійв бугаїв на 1–2 години, порівняно з традиційним середовищем.

Тому метою дослідження було вивчення впливу різних концентрацій екстракту лялечок дубового шовкопряда на якість сперми кнурів впродовж інкубування *in vitro* за використання середовища «Екосперм В».

Матеріал і методи. Дослідження проведені у Львівському НВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення Інституту біології тварин НААН. Об'єктом досліджень була сперма кнурів породи дюрок ($n=3$), яку відбирали мануально на чучело з режимом використання 2 рази на тиждень. В експерименті використали 12 еякулятів. Після отримання визначали об'єм, концентрацію спермійв в еякуляті та транспортували у клімабоксі при температурі $+17^{\circ}\text{C}$. З кожного еякуляту було сформовано 6 проб (контрольну і 5 дослідних). Сперму всіх проб розріджували середовищем «Екосперм В», з додаванням у дослідні зразки різних концентрацій водного екстракту лялечок дубового шовкопряда: 1 дослідна проба – 1%, 2 дослідна – 1,25%, 3 дослідна – 2,5%, 4 дослідна – 3,75%, 5 дослідна – 5%.

Після розрідження сперму кнурів інкубували *in vitro* при температурі $+17$ – 18°C впродовж 5 діб. Щоденно визначали активність та динамічні показники спермійв з використанням комп'ютеризованої системи CASA (Computer Assisted Semen Analysis) – SpermVision. Проводили вимірювання таких параметрів як активність (%), ППП – прямолінійно-поступальний рух (%); VAP – швидкість просування головки спермія по середній траєкторії руху (мкм/с); VSL – швидкість спермійв уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (мкм/с); VCL – швидкість при криволінійному русі (мкм/с); STR – ступінь прямолінійності руху спермійв (%); LIN – ступінь лінійності (%). Статистичну обробку даних проводили комп'ютерним аналізом рухливості спермійв впродовж 5 діб інкубування *in vitro*.

Результати досліджень: Встановлено, що найвища активність спермійв впродовж усього періоду культивування *in vitro* зберігалася у 3, 4 і 5-й дослідних пробах сперми, у яких використовували 2,5, 3,75 і 5%-ну концентрацію водного екстракту лялечок дубового шовкопряда (табл.1). У даних пробах сперми при культивуванні від першої до третьої доби зниження активності сперми було незначним – лише 5,0-9,7 %. А між третьою і п'ятою добою різниця становила 19,0, 21,9 і 25,5 %. Проте у контрольній, 1 і 2-й

дослідних пробах між третьою і п'ятою добою інкубування активність сперміїв різко знижувалася – відповідно на 26,5, 29,5 і 26,1 %.

На п'яту добу інкубування активність сперміїв у контрольній, 3, 4 і 5-й дослідних пробах була досить високою та перевищувала 50,0 % (52,68; 56,33; 59,86; 62,65, відповідно), що вказує на її придатність для штучного осіменіння свиноматок.

Таблиця 1

Динамічні характеристики сперми кнурів-плідників за інкубування при +17°C, n=12

Показники впродовж інкубування	Проби сперми						P
	К	1 Д	2 Д	3 Д	4Д	5 Д	
Доба 1							
Активність, %	90,0	95,0	93,0	92,5	95,0	94,0	<0,01
ППР, %	71,5	73,9	74,6	81,2	78,8	75,6	<0,05
VCL, мкм/с	128,8	144,8	136,2	157,8	175,7	153,9	<0,05
VAP мкм/с	63,1	74,9	69,8	75,6	96,1	76,7	< 0,05
VSL мкм/с	46,0	55,3	51,9	58,8	72,5	56,9	< 0,01
LIN, %	35,7	38,2	38,1	37,3	41,3	37,0	< 0,05
STR, %	72,9	73,8	74,3	77,7	75,4	74,2	< 0,01
Доба 3							
Активність %	82,5	85,0	83,4	87,5	85,3	85,5	< 0,01
ППР, %	58,7	61,1	64,3	75,7	71,8	68,8	< 0,01
VCL, мкм/с	104,6	136,2	119,8	155,6	165,4	141,1	< 0,05
VAP, мкм/с	57,4	69,9	67,3	77,5	92,2	70,4	< 0,01
VSL, мкм/с	38,7	48,1	47,3	56,6	65,3	49,9	< 0,05
LIN, %	37,0	35,3	39,5	36,4	39,4	35,4	< 0,01
STR, %	67,4	68,8	70,3	73,0	70,8	70,9	< 0,01
Доба 5							
Активність, %	56,0	55,5	57,3	68,5	63,4	60,0	< 0,01
ППР, %	52,7	47,7	50,9	62,6	59,8	56,3	< 0,01
VCL, мкм/с	127,8	115,4	100,9	134,7	136,5	121,3	< 0, 01
VAP, мкм/с	63,1	69,8	59,4	60,1	65,2	57,5	< 0,05
VSL, мкм/с	43,0	38,4	33,7	43,8	46,8	40,6	< 0,01
LIN, %	33,6	33,3	33,3	32,5	34,2	33,5	< 0,01
STR, %	68,1	55,0	56,7	72,9	71,8	70,6	< 0,01

Примітка: 1Д, 2Д, 3Д, 4Д і 5Д – перша, друга, третя, четверта і п'ята дослідні проби сперми.

Таким чином, після аналізу отриманих результатів, слід відзначити, що застосування 2,5, 3,75, 5 % -ї концентрації водного екстракту лялечок дубового шовкопряда забезпечує високу активність сперміїв кнурів породи дюрок впродовж 5 діб інкубування. Біологічно активні речовини гідрофільного екстракту лялечок шовкопряда сприяють зберіганню біологічної повноцінності сперміїв при інкубуванні в охолодженому стані протягом 5 днів.

Аналізуючи динамічні характеристики рухливості спермій у 1-й день розбавлення, ми відмітили найвищі показники (VSL, LIN, STR) у 3, 4 і 5-й дослідних пробах: VSL – 58,8 мкм/с, LIN – 37,3 %, STR – 77,7 % – для 3-ї дослідної проби; VSL – 72,5 мкм/с, LIN – 41,3 %, STR – 75,4 % – для 4-ї дослідної проби, VSL – 56,9 мкм/с, LIN – 37,0 %, STR% – 74,2 % – для 5-ї дослідної проби.

У 1-й день в 3, 4 і 5-й дослідних пробах прямолінійно-поступальний рух був прямо пропорційний прямолінійності руху спермій. Упродовж п'яти діб інкубування спостерігалась низька мінливість цих показників. На п'яту добу зберігання середовище у 3-й дослідній пробі сперми забезпечило найвищу активність та життєздатність спермій (ППР – 62,6 %; STR – 72,9 %). При додаванні у склад середовища менших концентрацій екстракту шовкопряда було відмічено зниження динамічних характеристик сперми. Так у 1 і 2-й дослідних пробах сперми протягом 3-х днів інкубування ППР зменшувався на 12,8 %, VSL – 7,2 % та STR – 5 %, проте до 5 дня інкубування показники знизилися до 14 %.

Характеризуючи швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL), варто відзначити, що у 3-й дослідній пробі, де додавали до середовища 2,5 %-й екстракт лялечок дубового шовкопряда було найменше варіювання цього показника, а саме: на 1-у добу VSL становило 58,8 мкм/с; на 3-й день – 56,6 мкм/с; на 5-й день – 43,8 мкм/с. Також у даній пробі сперми ступінь лінійності (LIN) був мінімальний: на 1-й день він становив 37,3 %, на 3-й день – 36,4 %, на 5-й день – 32,5 %.

У 3, 4 і 5-й дослідних пробах, де до середовища додавали 2,5, 3,75 і 5 %-й гідрофільний екстракт лялечок дубового шовкопряда, спостерігалась вища швидкість при криволінійному русі, яка, відповідно, на 1-й день інкубування становила-157,8, 175,7 і 153,9 мкм/с; на 3-й день – 155,6, 165,4 і 141,1 мкм/с; на 5-й день – 134,7, 136,5 і 121,3 мкм/с. Дещо нижчу швидкість при криволінійному русі було відмічено у контрольній пробі, де на 1-й день VSL було 128,8 мкм/с; на 3-й день – 104,6 і на 5-й день – 127,8 мкм/с.

Висновки. Застосування 2,5, 3,75 і 5 %-ї концентрації водного екстракту лялечок дубового шовкопряда забезпечує високу активність спермій кнуря породи дюрок впродовж п'яти діб інкубування *in vitro*. Найвища активність спермій впродовж усього періоду культивування *in vitro* зберігалася у 3, 4 і 5-й дослідних пробах сперми. Швидкість прямолінійного руху головки спермія уздовж прямого відрізка між початковою і кінцевою точками траєкторії (VSL), варто відмітити, що у 3-й дослідній пробі, де додавали до середовища 2,5 %-у концентрацію гідрофільного екстракту лялечок дубового шовкопряда, мала найменше варіювання впродовж інкубування *in vitro*.

Література

1. Інструкція із штучного осіменіння свиней. Інструкція / Відповідальний за випуск Ю.Ф. Мельник. — Київ: Аграрна наука. — 2003. — 56 с.

2.Huo L.J. Characterization viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. / L.J. Huo, K.Z. Yue, Z.M. Yang // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2002. — V.14. — №7-8. — P. 509-514.

3.Watson P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: Rath, D. Johnson, L.A., Weitze, K.F., (Eds.), *Boar Semen Preservation III Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation*, Mariensee, Germany, August, 1995, *Reprod. Domest. Anim.* — Vol. 31. — Blackwell, Berlin. — 1996. — P. 135-140.

4.Федина Н. И. Криозащитное влияние различных антиоксидантов и БАВ при хранении спермы хряков в охлажденном и замороженном состоянии: дис. ... кандидата биол. наук: 06.02.01 / Федина Наталья Игоревна. — п. Лесные Поляны Московской обл., 2007. — 112 с.

5.Епишина Т. М. Совершенствование способов повышения воспроизводительных качеств свиней и овец: дис. ... доктора биол. наук: 06.02.07 / Москва, 2011 — 293 с.

6.Препарат біологічно активний “Антерин—ТАД”. Технічні умови: ТУ У 24.4—00493706—001:2009. – ДКПП 24.42.13. – УКНД 11.220. / В.О. Трокоз, Т.Б. Аретинська, Н.В. Трокоз. – Затверджено НУБіП України. 25.05.2009. – Погоджено ДНДКІ ветпрепаратів і кормових добавок 09.06.2009, Державним комітетом ветеринарної медицини України 13.07.2009. – 14 с.

7.Чиркин А.А. Открытие и исследование антиоксидантной активности компонентов куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, Е.Ж. Коваленко, Дж.У. Паршонок, Т.А. Толкачева // *Материалы международной Научно—практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы стресса»* — Витебск, 2010. — С. 26-27.

8.Деклараційний патент на корисну модель № 47713. Україна. А01 К 67/00 (2009). Середовище для розморожування глибокозамороженої сперми бугаїв. / В.О. Трокоз, А.П. Кругляк, А.В. Трокоз, А.О. Архипов, Л.С. Саулко. – Заявл. 09.07.2009. u200907153. – Патентовласник НУБіП України. – Опубл. 25.02.2010. – Бюл. №4. 2010.

Summary

Horchun S., Sharan M., Yaremchuk I.

CHARACTERISTIC OF DYNAMIC PARAMETERS OF BOAR SPERMATOZOA FOR THE USE OF A HYDROPHILIC EXTRACT OF OAK SILKWORM PUPAE IN THE SEMEN DILUENT.

The results of studies of sperm quality within 5 days of incubation in vitro by using aqueous extract of oak silkworm pupae in the environment for dilution.

It is found that hydrophilic extract of oak silkworm pupae in concentration of 2.5%, 3.75% and 5% - as a part of diluent "Ekosperm B" provides high activity of boar spermatozoa during incubation in vitro. On the fifth day, the percentage of active and progressive active spermatozoa in the experimental sample, where 2.5% - silkworm pupae concentration was added was highest 62.6 and 68,5 %, which is 9,9 and 12,5 % higher than those same parameters in control.

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