

УДК: 636.2:591.463.1.

Кава С.Й., Дмитрів О.Я.,*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького***Остапів Д.Д., Яремчук І.М., Кузьміна Н.В.***Інститут біології тварин НААН, м. Львів***ВМІСТ ЛІПОПРОТЕЇНІВ СПЕРМИ ЗА РОЗРІДЖЕННЯ ЕЯКУЛЯТІВ
БУГАЯ РОЗБАВНИКАМИ З ЯЄЧНИМ ЖОВТКОМ**

Вивчали вміст ліпопротеїнів еякулятах бугаїв за розрідження розбавниками з яєчним жовтком. Встановлено, що для свіжоотриманої сперми характерний вміст фракцій ліпопротеїнів (%): хіломікрон - $19,6 \pm 3,21$, дуже низької - $11,2 \pm 2,36$, низької - $22,9 \pm 2,26$, високої - $21,2 \pm 1,77$ і дуже високої - $24,0 \pm 2,76$ щільності. Розрідження еякулятів знижує на 8,3 - 10,0 % хіломікрон і підвищує на 2,0 - 7,7 % дуже низької та 3,4 - 4,3 % низької щільності ліпопротеїнів. Інкубування сперми впродовж 4 діб змінює співвідношення ліпопротеїнів у бік підвищення вмісту великого і зниження - малого розміру молекул. При цьому, найбільше хіломікрон встановлено в еякулятах розбавлених середовищем «Оптиміл» ($40,6 \pm 2,84$ %) і менше ($31,6 - 37,6$ %) - лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем і в нерозбавленій спермі. Виживання спермій у нерозбавленій спермі - $110,5 \pm 5,70$ год, вище на 16,9 год (13,3 %) при розрідженні еякулятів лактозо-жовтково-гліцериновим розріджувачем і найвище ($156,3 \pm 14,56$ год) при використанні «Оптимілу»

Ключові слова: ліпопротеїни, спермії, виживання, сперма, бугайі.

Ефективність штучного осіменіння корів значною мірою залежить від складу середовищ, які використовують для розрідження еякулятів бугаїв. В основному розріджувачі містять речовини, які здатні забезпечувати захист і збереження метаболічної активності статевих клітин за технологічної обробки сперми і високу запліднювальну здатність спермій [1 - 3]. Зокрема, в склад розріджувачів включають гліцерин і цукри, а в якості джерела ліпідів - жовток яєць курей [4]. При цьому, в практиці роботи племпідприємств використовуються, в основному, розріджувачі сперми бугаїв з обов'язковою присутністю в їх складі жовтка яєць та гліцерину і з додаванням глюкози, фруктози, рафінози чи лактози окремо або у поєднанні в різних співвідношеннях.

Мета роботи - вивчити вплив жовтково-гліцеринових розріджувачів різної рецептури на формування ліпопротеїнових комплексів сперми бугаїв.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені на базі ТзОВ ЛНВЦ «Західплемресурси», Інституту біології тварин НААН і кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г. В. Звереві ЛНУВМ та БТ імені С.З. Гжицького. Еякуляти бугаїв отримували на штучну вагіну з режимом використання дуплетна садка два рази на тиждень через дві доби. Свіжоотриману сперму оцінювали за об'ємом (мл), активністю (рухливістю; %) та концентрацією спермій (10^9 клітин/мл). Для досліджень

відбирали еякуляти об'ємом більше 2,0 мл, концентрацією - більше $0,7 \times 10^9$ клітин/мл та 70 % і більше живих спермій. Для виявлення впливу складу розріджувача еякулят ділили на частини: нерозбавлений свіжоотриманий і розбавлений лактозо-жовтково-гліцериновим середовищем (ЛЖГР: лактоза – 11,5 г, жовток курячих яєць – 20 мл, гліцерин – 5,0 мл і вода – 100 мл) та «Оптидил» (готовий комерційний продукт зі складом: трис-буфер, яєчний жовток, гліцерин).

У еякулятах свіжоотриманих нерозбавлених, розріджених середовищами та інкубованих 4 доби при 2 - 4°C вивчали вміст фракцій ліпопротеїнів (ЛП; %) методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) і виживання спермій до припинення прямолінійно-поступального руху (год). Для дослідження ЛП формували пластини ПААГ з градієнтном концентрацій акриламід: 3,5 %, 5,0 % та 7,5 %. Для електрофорезу попередньо зразки сперми фарбували (до 0,1мл свіжоотриманої сперми додавали 0,03 мл 0,1% розчин фарб Судан III + Судан IV (1:1) у 70 % етиловому спирті) і 30 хв інкубування в темноті. В лунки концентруючого гелю вносили 0,07 мл суміші. Кількісний аналіз і визначення вмісту ліпопротеїнів (%) проводили прямим скануванням гелів на аналізаторі електрофореграм «АФ-1», довжина хвилі 610 нм.

Результати досліджень. Для свіжоотриманих еякулятів бугаїв характерний вміст фракцій ліпопротеїнів (ЛП; %): хіломікрон (ХМ) - $19,6 \pm 3,21$, дуже низької (ДНЦ) - $11,2 \pm 2,36$, низької (НЦ) – $22,9 \pm 2,26$, високої (ВЦ) - $21,2 \pm 1,77$ і дуже високої щільності (ДВЦ) - $24,0 \pm 2,76$ (табл.). За розрідження еякулятів вміст фракцій ЛП змінюється.

Таблиця 1

Вміст ліпопротеїнів залежно від складу розріджувача і тривалості інкубування сперми бугаїв (n =13; M±m)

ЛП, %	Свіжоотримана			Інкубована 4 доби при 2 - 4°C:		
	неробавлена	розріджена:		неробавлена	розріджена:	
		ЛЖГР	«Оптидил»		ЛЖГР	«Оптидил»
ХМ	$19,6 \pm 3,21$	$9,6 \pm 2,82$	$11,3 \pm 2,48$	$37,6 \pm 10,17$	$31,6 \pm 5,69^{**}$	$40,6 \pm 2,84^{***}$
ДНЦ	$11,2 \pm 2,36$	$18,9 \pm 4,82$	$13,2 \pm 3,41$	$13,4 \pm 3,72$	$11,5 \pm 4,02$	$8,8 \pm 3,06$
НЦ	$22,9 \pm 2,26$	$26,3 \pm 3,39$	$27,2 \pm 3,25$	$12,9 \pm 2,98^*$	$13,4 \pm 2,59^{**}$	$13,7 \pm 1,80^{**}$
ВЦ	$21,2 \pm 1,77$	$22,3 \pm 1,78$	$22,6 \pm 1,71$	$17,6 \pm 4,20$	$21,4 \pm 2,52$	$20,1 \pm 2,70$
ДВЦ	$24,0 \pm 2,76$	$23,4 \pm 2,26$	$25,7 \pm 4,10$	$18,4 \pm 5,32$	$20,1 \pm 2,09$	$16,6 \pm 1,66^*$

* Примітка: різниця статистично вірогідна - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Так, за використання ЛЖГР і «Оптидилом» знижується вміст, відповідно, на 10,0 і 8,3 % ХМ та зростає на 7,7 і 2,0 % ДНЦ і на 3,4 і 4,3 % НЦ, порівняно з нерозбавленим еякулятом. Вміст ліпопротеїнів ВЦ і ДВЦ не змінюється і становить, відповідно, 21,2 - 22,6 і 23,4 - 25,7%. Різниця між величинами значень знаходиться в межах похибки середнього арифметичного (1,4 – 2,3 %). Інкубування сперми при 2 - 4°C призводить до втрат (розщеплення) ліпопротеїнових комплексів, що проявляється на фореграмах меншою інтенсивністю забарвлення смуг ліпопротеїнів (рис.1).

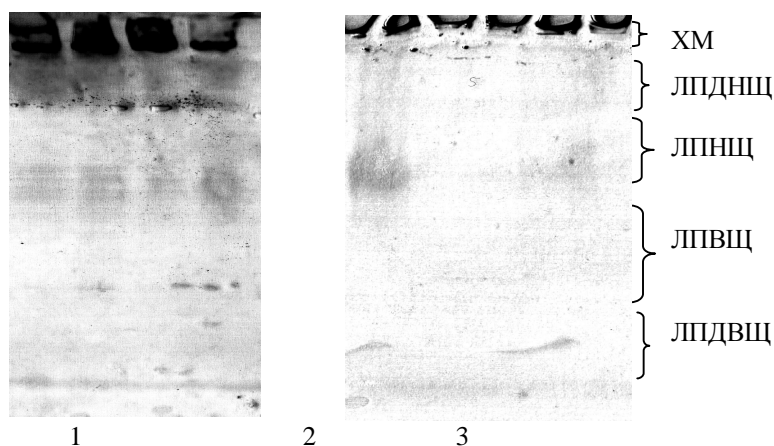


Рис.1. Ліпопротеїни сперми:

1 – свіжоотриманої нерозбавленої; 2 – розбавленої ЛЖГР; 3 - розбавленої ЛЖГР та інкубованої 4 доби при 2-4°С.

Поряд з цим, зростає вміст ХМ у спермі нерозбавленій на 18,0 %, розрідженій ЛЖГР на 22,0 % ($p < 0,01$) і «Оптидилом» на 29,3 % ($p < 0,001$), порівняно з величинами значень до інкубування. На противагу, вміст інших фракцій ліпопротеїнів знижується: у нерозбавлених еякулятах на 2,2 % ДНЩ, на 10,0 % ($p < 0,05$) НЩ, на 3,6 % ВЩ і на 5,4 % ДВЩ; у розбавлених ЛЖГР, відповідно, 7,4, 12,9 ($p < 0,01$), 0,9 і 3,3 % та «Оптидилом» - 4,4, 13,5 ($p < 0,01$), 2,5 і 9,1 % ($p < 0,05$). Ймовірною причиною зниження інтенсивності зафарбування смуг ліпопротеїнів в спермі за інкубування (нерозбавленій і розрідженій) є використання сперміями ліпопротеїнів (плазми сперми й розріджувачів) як шляхом їх включення в мембранні структури статевих клітин, так і для ресинтезу АТФ в ланцюгу дихання мітохондрій [8]. Дане припущення підтверджується тривалістю виживання спермій, величина якого найнижча у нерозбавленій спермі ($110,5 \pm 5,70$ год), вища на 16,9 год (13,3 %) при розрідженні еякулятів ЛЖГР і найвища ($156,3 \pm 14,56$ год) при використанні «Оптидилу» (рис. 2).

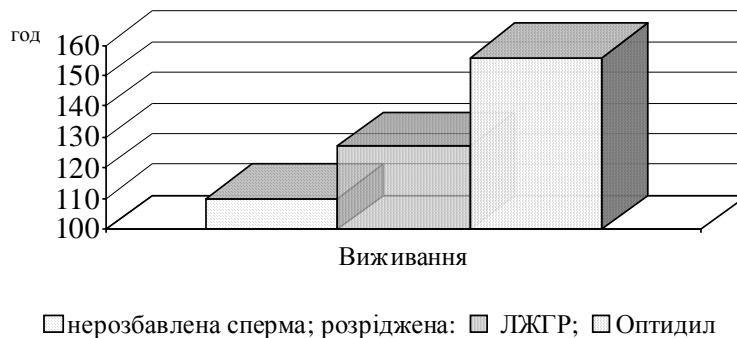


Рис. 2. Виживання спермій за інкубування сперми при 2 - 4°С

Таким чином, середовище «Оптидил» містить оптимальні концентрації компонентів, в тому числі жовток курячих яєць, які забезпечують збереження ліпопротеїнових комплексів сперми бугаїв і високе виживання спермій.

Висновки

1. Для свіжоотриманої сперми характерний вміст фракцій ліпопротеїнів (%): хіломікрон - $19,6 \pm 3,21$, дуже низької - $11,2 \pm 2,36$, низької - $22,9 \pm 2,26$, високої - $21,2 \pm 1,77$ і дуже високої щільності - $24,0 \pm 2,76$.

2. Розрідження еякулятів призводить до зниження на 8,3 - 10,0 % хіломікрон і підвищення на 2,0 - 7,7 % дуже низької та 3,4 - 4,3 % низької щільності ліпопротеїнів.

3. Інкубування сперми впродовж 4 діб змінює співвідношення ліпопротеїнів у бік підвищення вмісту великого (хіломікрон) і зниження - малого розміру молекул.

4. Виживання спермій у нерозбавленій спермі - $110,5 \pm 5,70$ год, вище на 16,9 год (13,3 %) при розрідженні еякулятів ЛЖГР і найвище ($156,3 \pm 14,56$ год) при використанні «Оптидilu».

Перспективи подальших досліджень. Дослідити вміст ліпопротеїнів кріоконсервованої сперми бугаїв за використання різного складу розріджувачів.

Література

1. Наук В. А Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации /В. А. Наук – Кишнев: -Штеница, 1991.-197с.

2. Сперма бугаїв нативна. Технічні умови: ДСТУ 3535-97.

3. Середовище для розбавлення і заморожування сперми бугаїв: Патент України № 10894; Публ. 29.12.99, Бюл. №8.-12с.

4. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. К: Аграрна наука, 1995. – 182с.

Summary

Kawa S., Dmytryv O., Ostapiv D., Jaremchuk I. , Kuzmina N.

LIPOPROTEIN CONTENT IN SPERM ON BULL EJACULATE DILUTION WITH DILUENTS THAT HAVE EGG YOLK

Lipoprotein content in bull ejaculates under dilution by diluents that have egg yolk was studied. It is set that freshly obtained semen characterizes by such lipoprotein fractions (%): chylomicron – $19,6 \pm 3,21$, very low – $11,2 \pm 2,36$, low – $22,9 \pm 2,26$, high – $21,2 \pm 1,77$ i very high – $24,0 \pm 2,76$ density. Ejaculate dilution lowers chylomicron fraction on 8,3 – 10,0 % and increases on 2,0 – 7,7 % and 3,4 – 4,3 % lipoproteins with very low and low density. Sperm incubation within 4 days changes lipoprotein interrelation upward great molecules while small molecules content decrease. At the same time, highest content of chilomicrons is found in ejaculates diluted by “Optidil” ($40,6 \pm 2,84$ %) and less (31,6 - 37,6 %) in lactose-yolk-glycerin diluent and in non diluted semen. Survival of spermatozoa in non diluted semen – $110,5 \pm 5,70$ h, under dilution by lactose-yolk-glycerin diluent higher on 16,9 h (13,3 %), and the higher survival ($156,3 \pm 14,56$ год) is under usage of “Optidil”.

Key words: lipoprotein, spermatozoa, survival, semen, bull.

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