

**ЯКІСНІ ПОКАЗНИКИ СПЕРМИ БАРАНІВ
ЗА ВИКОРИСТАННЯ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ ТА БСА
У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ**

М. М. Шаран, доктор сільськогосподарських наук

*Х. М. Гримак, аспірант**

Інститут біології тварин НААН

Проведеними дослідженнями встановлено, що додавання 5 μ M відновленого глутатіону і 15 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну до складу лактозо-жовтково-трис-цитрато-гліцеринового середовища для заморожування сперми баранів підвищило антиоксидантний захист спермій та зменшило пошкодження їхніх мембран, що підтверджується збільшенням активності глутатіонпероксидази та супероксид-дисмутази у сперміях, а також зниженням вмісту ТБК-активних продуктів та активності аспартатамінотрансферази у плазмі сперми.

Сперма, баран, кріоконсервація глутатіон, бичачий сироватковий альбумін, антиоксидантний захист.

*Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук М. М. Шаран

© М. М. Шаран, Х. М. Гримак, 2014

Ефективність кріоконсервування сперми значною мірою залежить від складу синтетичних середовищ. З метою запобігання надмірного накопичення токсичних продуктів пероксидації ліпідів у спермі баранів у процесі еквілібрації та зберігання в охолодженому й глибокозамороженому стані, ряд дослідників пропонують використовувати у складі середовищ різні антиоксиданти [7, 2, 1, 6]. У літературі також наявні повідомлення про позитивний вплив бичачого сироваткового альбуміну й тіолових сполук на зберігання біологічної повноцінності сперміїв тварин [4, 5]. Водночас, немає даних про вплив комбінованого використання БСА та глутатіону в середовищах для глибокого заморожування сперми баранів.

Мета досліджень – з'ясувати антиоксидантну та кріопротекторну дію відновленого глутатіону та БСА в складі лактозо-жовтково-трис-цитрато-гліцеринового середовища (ЛЖТЦГС) для заморожування сперми баранів.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили в СФГ «Салдобош» Хустського району Закарпатської області. В експерименті використали 18 еякулятів від шести баранів української гірськокарпатської породи. Свіжоодержані еякуляти з активністю 8–9 балів розбавляли ЛЖТЦГС у співвідношенні 1:3 і розділяли на дві групи: контрольну й дослідну. У дослідній групі до складу ЛЖТЦГС вводили 5 μ M відновленого глутатіону та 15 мг/мл БСА. Після розведення сперму еквілібрували (4 °C, 2,5 години) і заморожували в рідкому азоті. Після розрідження, еквілібрації та розморожування проводили біохімічні дослідження сперміїв та розрідженої плазми за методиками, описаними у «Довіднику» [3]. Для відокремлення сперміїв від розрідженої сім'яної плазми сперму центрифугували за 3000 об/хв протягом 20 хвилин. У сперміях визначали активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) та ензимів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази (ГПО) і каталази (КАТ). У розрідженій плазмі сперми визначали активність аспартатамінотрансферази (АсАТ), кількість ТБК-активних продуктів.

Статистичне опрацювання отриманих цифрових даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Excel-2003» з використанням критерію Стьюдента.

Результати досліджень. Досліджуючи систему антиоксидантного захисту сперми кнурів впродовж зберігання в охолодженому стані, встановлено зростання активності антиоксидантних ензимів у дослідних пробах сперми. Активність ГПО і СОД у сперміях дослідної групи після еквілібрації була вищою на 24,4 % ($p < 0,01$) та 12,0 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем (табл. 1).

Аналогічно після розморожування активність ГПО і СОД у дослідних зразках була вищою на 28,6 % ($p < 0,01$) та 19,7 % ($p < 0,05$), порівняно з контролем. Водночас, різниця між дослідними та контрольними зразками за активністю КАТ була незначною і становила 2,9 % після еквілібрації та 12,5 % після розморожування сперми.

Оскільки відомо, що ЛДГ каталізує зворотне окиснення лактату в пірват у присутності НАД і ϵ , таким чином, ензимом, що сполучає дихання і

гліколіз, ми оцінювали зміни вуглеводного обміну у сперміях баранів у процесі кріоконсервування сперми за активністю ЛДГ.

1. Активність ЛДГ і ензимів антиоксидантного захисту у сперміях баранів, $M \pm m$, $n=9$

Показники	Після розрідження	Після еквілібрації		Після розморожування	
		К	Д	К	Д
СОД, МО/мг білка	48,2±2,82	38,2±2,01	42,8±2,02	29,4±1,96	48,2±2,82
ГПО, мкмоль/хв. ×мг білка	0,53±0,06	0,45±0,05	0,56±0,04*	0,35±0,03	0,53±0,06
КАТ, мкмоль/хв. ×мг білка	0,30±0,04	0,35±0,03	0,34±0,04*	0,40±0,04	0,30±0,04
ЛДГ, нмоль/хв. × мг білка	25,4±2,81	16,0±1,44	18,8±2,54	7,9±0,63	25,4±2,81

Зокрема, активність ензиму в сперміях контрольних проб після еквілібрації зменшилася на 37,0 % ($p < 0,01$), а після заморожування-відтавання становила лише 31,1 % ($p < 0,001$) від початкового рівня розрідженої сперми. Одночасно з виходом ЛДГ зі сперміїв, охолодження і заморожування-відтавання сперми викликає й інактивацію ензиму, яка пов'язана з окисненням сульфгідрильних груп лактатдегідрогенази. Водночас, у дослідних зразках активність ЛДГ у сперміях після еквілібрації була вищою від контрольних проб на 17,5 % ($p < 0,05$), а після деконсервування переважала контроль на 24,1 % ($p < 0,01$), що свідчить про зменшення пошкоджень статевих клітин.

Оцінюючи інтенсивність пероксидації ліпідів у процесі кріоконсервування сперми баранів, встановлено підвищення вмісту кінцевих метаболітів ПОЛ (ТБК-активних продуктів) у дослідних зразках сперми. Так, вміст ТБК-активних продуктів у дослідних пробах сперми після еквілібрації збільшився на 10,8 % ($p < 0,05$), а після заморожування-відтавання – на 29,2 % ($p < 0,05$) від початкового рівня розрідженої сперми (табл. 2).

2. Уміст ТБК-активних продуктів і активність АСТ у плазмі сперми баранів, $M \pm m$, $n=9$

Показники	Після розрідження	Після еквілібрації		Після розморожування	
		К	Д	К	Д
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	6,5±0,32	7,2±0,33	5,6±0,29**	8,4±0,44	6,1±0,21***
АСТ, нмоль/хв. ×мг білка	4,7±0,68	6,6±0,53	5,8±0,42	8,6±0,47	7,2±0,46*

Додавання глутатіону з БСА до середовища спричинило зменшення кількості ТБК-активних продуктів у розрідженій сім'яній плазмі після еквілібрації на 22,2 % ($p < 0,01$), після розморожування – на 27,4 % ($p < 0,01$), порівняно з контрольним середовищем.

Активність АСТ у плазмі сперми теж зросла у процесі кріоконсервування сперми баранів, хоча величина зростання у пробах була різною.

Зокрема, у дослідних зразках активність АСТ після еквілібрації була вищою на 40,4 % ($p < 0,01$), а після розморожування – на 83,0 % ($p < 0,001$) від початкового рівня розрідженої сперми. Введення глутатіону з БСА до складу середовища зумовило зниження активності АСТ у сім'яній плазмі після еквілібрації на 12,1 % ($p < 0,05$), після розморожування – на 16,3 % ($p < 0,05$), порівняно з контрольним середовищем, що свідчить про зменшення пошкоджень сперміїв.

Отже, дослідженням біохімічних показників сперми баранів, як маркерів пошкоджень статевих клітин, підтверджено позитивну дію додавання відновленого глутатіону з БСА до середовища для кріоконсервації, яка проявилася підвищенням активності ензимів антиоксидантного захисту та ЛДГ у сперміях, а також зниженням вмісту ТБК-активних продуктів та активності АСТ у плазмі сперми, що свідчить про зменшення руйнувань мембран сперміїв.

Висновки

Додавання до ЛЖТЦГ середовища 5 μ M відновленого глутатіону і 15 мг/мл БСА призводить до зростання активності антиоксидантних ензимів (СОД і ГПО) і ЛДГ у сперміях після еквілібрації, відповідно, на 12,0, 24,4 і 17,5 %, після заморожування-відтавання – на 19,7, 28,6 і 24,1 %, а також знижує вміст ТБК-активних продуктів і активності АСТ у плазмі сперми після еквілібрації, відповідно, на 22,2 і 12,1 %, після розморожування – на 27,4 і 16,3 %, що свідчить про зменшення руйнувань мембран сперміїв. Отримані результати можуть бути основою для поглиблених досліджень з удосконалення середовища для кріоконсервації сперми баранів та апробації його в практику вівчарства.

Список літератури

1. Деряженцев В. И. Влияние сорбита и лактозы на криоустойчивость спермы, баранов // В. И. Деряженцев, Т. М. Епишина // Биология воспроизведения и биотехнологические методы разведения : сб. трудов. – М. : 1992. – С. 84–86.
2. Ерохин А. С. Криозащитное действие новых синтетических антиоксидантов при криоконсервации спермы баранов / А. С. Ерохин, Т. М. Епишина, А. Г. Никифоров // Сельскохозяйственная биология. – 1996. – № 6. – С. 19–21.
3. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.] ; за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 202 с.
4. Ali A. Studies of the effect of semi-defined diluents on the cryo-tolerance of spermatozoa and in vitro production embryos / A. Ali, B. Talib // ANNO ACCADEMICO. – 2009–2010. – P. 138.
5. Ashrafi I. Antioxidant effects of bovine serum albumin on kinetics, microscopic and oxidative characters of cryopreserved bull spermatozoa / I. Ashrafi, H. Kohram, H. Tayefi-Nasrabadi // Spanish Journal of Agricultural Research. — 2013. – № 11 (3). – P. 695–701.
6. Solouma, G. M. A The influence of adding glutathione on semen characteristics of sohagi rams / G. M. Solouma // Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences. – 2013. – Vol. 8 (2). – P. 61–68.

7. Uysal O. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen / O. Uysal, M. N. Bucak // ACTA VET. BRNO. – 2007. – № 76. – P. 383–390.

Проведенными исследованиями установлено, что добавление 5 μ M восстановленного глутатиона и 15 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в состав лактозо-желтково-трис-цитрат-глицериновой среды для замораживания спермы баранов повысило антиоксидантную защиту спермиев и уменьшило повреждение их мембран, что подтверждается увеличением активности глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в спермиях, а также снижением содержания ТБК-активных продуктов и активности аспаратаминотрансферазы в плазме спермы.

Сперма, баран, криоконсервация глутатион, бычий сывороточный альбумин, антиоксидантная защита.

Results of the research show, that the adding of 5 μ M of reduced glutathione and 15 mg/ml of bovine serum albumin into the lactose-yolk-tris-citrate-glycerine extender for rams semen cryopreservation increased antioxidant protection of sperm and decrease the damages the sperm's membrane, which is confirmed by increasing of the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in sperms and by decreasing of the amount of TBARS and activity of aspartate aminotransferase in the seminal plasma.

Sperm, ram sheep, cryopreservation glutathione, bovine serum albumin, antioxidant protection.