

УДК 612.616.2+636:57.08

ЗМІНА pH СПЕРМИ КНУРА ПРОТЯГОМ ЗБЕРІГАННЯ ЇЇ ПРИ ОСЦИЛЮЮЧІЙ ТЕМПЕРАТУРИ ПОРІВНЯНО ЗІ ЗБЕРІГАННЯМ ПРИ ПОСТІЙНІЙ

Денисюк П. В., кандидат біологічних наук
denpv@ukr.net

Княз'єва К. В., аспірантка

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

36013, м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1

pigbreeding@ukr.net

Викладено результати зберігання рідкої сперми кнура при постійній температурі, порівняно з її зберіганням при температурі, що осцилює біоритмічно, зокрема з одногодинним періодом.

Дослідження проведено за допомогою клімат-контроль шафи, яку протягом усього періоду зберігання сперми по чергово то вимикали на тридцять хвилин, то вмикали на такий же час за допомогою електронних таймерів, запрограмованих нами з цією метою. Для отримання відносно постійного температурного режиму зберігання сперми використовували скляну банку об'ємом в один літр. В якості основного й найбільш об'єктивного показника впливу на сперму методу її зберігання вибрали pH, який змінювався від самого початку цього процесу. Теоретична підстава для вибору саме pH, як кількісного-якісного показника впливу на зберігання сперми методу його здійснення – гліколіз, як основний процес постачання енергії сперміям. Саме накопичення кінцевого продукту - молочної кислоти (лактату) - закислює сперму.

Ідея цього дослідження була такою: показати, що за осцилюючої температури сперма зберігається краще, ніж за постійної. Було припущено, що такий висновок можна зробити в тому разі, якщо pH сперми, яка зберігається при осцилюючій температурі, стає більшим за pH сперми, яка зберігається при постійній температурі. Адже це може свідчити про те, що в осцилюючих умовах середовища спермії витрачають менше глюкози на енергозабезпечення своєї життєздатності. І дійсно, було виявлено, що pH сперми, яка зберігається при біоритмічно осцилюючій температурі, стає більшим за pH сперми, яка зберігається при постійній температурі.

Наша робота дозволяє подолати уявлення про те, що процес зберігання найкраще й найбільше забезпечується постійними умовами середовища. Можна припустити, що осциляція умов середовища зберігання сперми корисна тим, що забезпечує взаємоперехід взаємопротилежних процесів, без якого не можливе існування не лише у звичайному середовищі, а й за умов зберігання.

Ключові слова: сперма, кнур, зберігання, температура, pH, осциляція, біоритм.

Зберігання сперми кнура в рідкому, за звичай розрідженому спеціальними розбавниками, стані, з наступним її використанням у штучному осіменінні, широко використовується у свинарстві переважаючої більшості країн [1]. До цього часу в багатьох лабораторіях світу продовжується пошук найкращого методу й умов зберігання такої сперми [2]. Під час та після зберігання сперму аналізують різними методами, зокре-

ма вимірюють її рН [3]. Уважають, що гліколіз - основний процес постачання енергії сперміям в умовах зберігання рідкої сперми. Так, за результатами одноденної інкубації сперми при 37°C в розчині Кребса-Рінгера було виявлено, що приблизно 95% енергії, яку отримує спермій із глюкози, походить із гліколізу, і лише біля 5% енергії – із мітохондріального дихання [4].

рН розрідженої сперми може змінюватися чи не змінюватися протягом її зберігання в залежності від природи розріджувача та інших умов. Так, рН рідкої розрідженої сперми знижувався в досліджах з використанням середовища ГХЦС [5]. За більш точними дослідженнями, рН сперми, розрідженої розріджувачем BTS, зменшувався під час її зберігання при температурі 20 і 25 °С і збільшувався при температурі 10 і 15 °С [6]. Було показано, що збільшення рН протягом зберігання негативно корелює з рухливістю спермійів [7], а тому, було зроблено висновок, що рН потрібно стабілізувати буферними системами. Прийнято вважати, що оптимальна температура зберігання рідкої розбавленої сперми – 17 °С [8] і теж повинна підтримуватися постійною.

Нами ж було показано, що доімплантаційні ембріони свині розвиваються поза організмом за рН, що осцилює з добовим періодом, значно краще, ніж за постійного рН [9, 10]. А осциляція температури з одноденним періодом могла сприяти збільшенню в культурі діаметра ооцит-кумулясних комплексів свині [11]. А тому, ми припустили, що й сперма може зберігатися за біоритмічно осцилюючої температури краще, ніж за постійної. Було вирішено, що такий висновок можна буде зробити в тому разі, якщо рН сперми, яка зберігається при осцилюючій температурі, стає більшим за рН сперми, яка зберігається при постійній температурі. Адже це може свідчити про те, що в осцилюючих умовах середовища спермії витрачають менше глюкози для енергозабезпечення життєздатності.

Перевірити це припущення і стало метою нашого дослідження.

Матеріали та методи досліджень. Сперму отримували на станції штучного осіменіння Інституту свинарства і АПВ НААН методом рука в рукавичці. Тут її фільтрували, частину відливали у флакон і перевозили в Інститут в лабораторію протягом не більше години. У лабораторії її розріджували 1 : 3 глюкозо-хелато-цитрато-сульфатним розріджувачем. Розріджувач готували власноручно з реактивів фірми Синбіас, Україна. Його стерилізували кип'ятінням 15 хв на водяній бані, охолоджували та додавали до нього гентаміцину сульфат. Розріджену сперму наливали в контрольний та дослідний флакони й укладали їх у клімат-шафу (Climate control, MS Schippers, Голландія), яку протягом усього періоду зберігання сперми почергово то вимикали на тридцять хвилин, то вмикали на такий же час за допомогою електронних таймерів Brilux, Польща та/або Fegon, Китай), запрограмованих нами з цією метою. Таким чином, використали існуючий метод створення біоритмічної осциляції температури з одноденним періодом [12]. Для отримання відносно постійного температурного режиму зберігання сперми використовували скляну банку об'ємом в один літр, яку вкладали з контрольним флаконом у ній в цю ж клімат-шафу з осцилюючою температурою поряд з флаконом із дослідною спермою.

В якості основного й найбільш об'єктивного показника впливу на сперму методу її зберігання вибрали рН, який змінювався від самого початку цього процесу. рН вимірювали іонометром (Иономер универсальный, ЭВ-74, СССР) в час постановки сперми на зберігання, а потім щодня через 23,5 год після попереднього вимірювання. З цією метою з флаконів відбирали по 0,3 мл сперми. Реєстрували діапазон зміни осцилюючої температури та вираховували амплітуду осциляції температури з одноденним періодом.

Результати й обговорення. Як видно з тих результатів дослідження, що представлені в таблиці, перевищення величини середнього рН (у перерахунку на один день зберігання) при осцилюючій температурі над рН при постійній, спостерігалось в де-

сяти з одинадцяти випадків зберігання сперми, причому у двох випадках воно було статистично значимим. А в тому випадку, в якому спостерігалось перевищення на користь постійної температури, воно було статистично не значимим. Хоча відмінність між впливом постійної й осцилюючої температури за показником рН по групі в цілому була статистично не значимою, видно, що при деякій достатній кількості випробувань з подібним результатом вона може стати статистично значимою. На статистично значимому відмінності на користь осцилюючої температури можна очікувати навіть при ще меншій кількості випробувань (n), якщо в наступному експерименті вибрати ті умови зберігання сперми, за яких амплітуда осциляції температури знаходиться в діапазоні від 0,2 °С до 0,5 °С. Саме з цим діапазоном амплітуд осцилюючої температури співпадають перший – третій ранги (найбільшого) перевищення рН при осцилюючій температурі над рН при постійній температурі.

Порівняння величини рН сперми за зберігання при постійній та осцилюючій температурі

№ з/п випадку зберігання сперми	Середній рН сперми, одиниць, при температурі		Статистична значимість порівняно з контролем, p	Перевищення рН при осцилюючій температурі над рН при постійній, одиниці	Ранг перевищення рН від найбільшого значення	Амплітуда осциляції температури з 1-годинним періодом, °С	Середня температура, навколо якої відбувалася її осциляція, °С
	постійній (контроль)	осцилюючій (дослід)					
1	6,05±0,36	6,09±0,32	> 0,05	0,043	4	0,20	17,4
2	6,46±0,28	6,54±0,27	> 0,05	0,076	2	0,34	20,66
3	6,84±0,08	6,9±0,07	> 0,05	0,06	10	0,25	19,41
4	6,23±0,04	6,29±0,03	> 0,05	0,063	3	0,20	18,15
5	6,38±0,03	6,38±0,03	> 0,05	0,008	9	0,20	16,58
6	6,42±0,03	6,45±0,03	> 0,05	0,037	5	0,20	15,01
7	6,45±0,02	6,55±0,01	<0,01	0,092	1	0,50	16,34
8	6,48±0,04	6,51±0,04	> 0,05	0,028	7	0,25	16,27
9	6,49±0,01	6,52±0,01	<0,05	0,033	6	0,02	16,04
10	6,35±0,02	6,35±0,02	> 0,05	-0,005	11	0,15	16,2
11	6,38±0,01	6,39±0,01	> 0,05	0,013	8	0,20	16,31
M±m	6,44±0,02	6,47±0,02	> 0,05	0,041±0,009	-	0,23±0,04	17,12±0,53

У нашому поясненні отриманих нами результатів ми виходимо, зокрема, з того, що гліколіз – основний процес постачання енергії сперміям [13]. Тобто, у процесі зберігання сперми глюкоза розпадається до лактату, який і закислює середовище. Якщо при осцилюючій температурі закислення виражено менше, ніж при постійній температурі, при осцилюючій температурі менше розпадається глюкози.

Одне з пояснень можливого механізму впливу біоритмічно осцилюючої величини параметра середовища на клітини, у тому числі й на гамети, - сприяння взаємоперехо-

ду взаємопротилежних сторін обміну речовин, - анаболізму й катаболізму. «Ми маємо чіткі докази того, - пише відомий біоритмолог [14], - що коливання є фундаментальною властивістю всього живого. Самі по собі коливання ... необхідні для того, щоб клітини періодично переходили з одного крайнього фізіологічного стану, в якому переважають анаболічні процеси, у другий, де переважають катаболічні процеси». Нами, також запропоновано найбільш загальне – філософське – обґрунтування осциляторного методу [15], до якого відноситься і зберігання (сперми) за осцилюючих умов.

За нашим уявленням, підвищення температури, як компонент її осциляції, сприяє катаболізму, зокрема й гліколітичному розпаду глюкози. А зниження температури, як компонент її осциляції, сприяє анаболізму, - процесам синтезу, відновлення структур клітини. При температурах же зберігання рідкої сперми (знижених порівняно з температурою тіла) обмін речовин в її гаметах не припиняється, хоча й перебуває в пригніченому стані. А тому, застосування осцилюючих параметрів до процесів зберігання може виявитися кориснішим за застосування постійного середовища.

Висновки. Сперма, яка зберігається у клімат-шафі, може набувати при температурі, осцилюючій з одногодинним періодом, статистично значимого більшого рН, ніж при постійній температурі. Це вказує на те, що сперма витрачає глюкози при осцилюючій температурі менше, ніж при постійній.

Перспективи подальших досліджень. Бачимо за корисне у подальшому виявити такі умови зберігання сперми, які дозволять збільшити різницю між впливом осцилюючої та постійної температури на користь осцилюючої.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Karunakaran, M., Chakurkar, E. B., Ratnakaran, U., et al. 2017. Characteristics of boar semen preserved at liquid state. *Journal of Applied Animal Research*. V. 45. N. 1. 217-220.
2. Dziekońska, A., Fraser, L., et Strzeżek, J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J. of Anim. and Feed Sci.* V. 18. 638–649.
3. Корнят, С. Б. 2011. Вплив глутатіону і цистеїну, доданих до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів, на її збереження. *Біологія тварин*. Т. 13. № 1–2. 112-118.
4. Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S. et al. 2003. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolic characterization. *FEBS Lett.* 554. 342-346.
5. Корнят, С. Б., Шаран, М. М., Андрушко, О. Б., та Корбецький, А. Р. 2008. Вплив фосфору, калію та сірки, введених в середовище для розбавлення сперми кнурів, на життєздатність сперміїв та метаболічні процеси в них. *Наук. – техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок*. Вип. 9, № 3. 219-225.
6. Paulenz, H., Kommisrud, E., et Hofmo, Po. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod. in Dom. Anim.* V. 35, Is. 2. 83–87.
7. Vyt, P., Maes, D., Sys, S. U., et al. 2007. Air contact influences the pH of extended porcine semen. *Reprod. Dom. Anim.* V. 42. 218–220.
8. De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., et al. 2006. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Intern. J. of Androl.* V. 29, Is. 5. 543–552.
9. Денисюк, П. В., та Мартыненко Н. А. 1995. Принципиально новый метод культивирования доимплантационных эмбрионов млекопитающих. Докл. НАН Украины. № 11. 148-149.

10. Денисюк, П. В. 1997. Вплив рН середовища на розвиток in vitro доімплантаційних ембріонів свині: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13. Інститут тваринництва УААН. Харків. 25.

11. Korchan, N., та Denysiuk, P. 2013. Development of pig cumulus-oocyte complexes at constant and oscillating temperature and pH. *Вісн. Київ. нац. ун. ім. Тараса Шевченка. Біологія*. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». Вип. 2 (64). 22-27.

12. Корчан, Н. О., и Денисюк, П. В. 2011. Спосіб культивування поза організмом ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) за температури, осцилюючої з одногодинним періодом. Патент 62419 UA, МПК (2011.01), A01N63/00. Заявник Інститут свинарства ім. О. В. Квасницького НААН України. № u 2011 01851; заявлено 17.02.2011; опубліковано 25.08.2011.

13. Cosson J. ATP: the sperm movement energizer. In Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. Kuestler E. and Traugott G. Editors. Nova Publisher Inc. - 2013. - P. 1-46. http://www.frov.jcu.cz/files/recentni_publicace/Cosson_Book_Chapter.pdf

14. Бюннинг, Э. 1964. *Биологические часы*. М.: Мир. 11 – 26.

15. Денисюк, П. В. 2017. Двоєдиний конструкт діалектичної логіки. *Філософські обрії* (Полтава). № 37. 68-77.

REFERENCES

1. Karunakaran, M., Chakurkar, E. V., Ratnakaran, U., та et al. 2017. *Characteristics of boar semen preserved at liquid state. Journal of Applied Animal Research*. V. 45. N. 1. 217-220.

2. Dziekońska, A., Fraser, L., та Strzeżek, J. 2009. *Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. J. of Anim. and Feed Sci.* V. 18. 638–649.

3. Kornjat, S. B. 2011. *Vpliv glutationu i cisteinu, dodanih do seredovishha dlja rozbavlenija i zberigannja spermi knuriv, na її zberezhemija. Biologija tvarin*. T. 13. № 1–2. 112 -118 (in Ukrainian).

4. Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S. . та et al. 2003. *Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolic characterization. FEBS Lett.* 554. 342 – 346.

5. Kornjat, S. B., Sharan, M. M., Andrushko, O. B., та Korbec'kij, A. R. 2008. *Vpliv fosforu, kaliju та sirki, vvedenih v seredovishhe dlja rozbavlenija spermi knuriv, na zhittezdatsnist' spermiiv та metabolichni procesi v nih. Nauk. – tehn. bjul. In-tu biologii tvarin та Derzh. n.-d. kontrol. in-tu vetpreparativ та korm. dobavok*. Vip. 9, № 3. 219 - 225 (in Ukrainian).

6. Paulenz, H., Kommisrud, E., та Hofmo, Po. 2000. *Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. Reprod. in Dom. Anim.* V. 35, Is. 2. 83–87.

7. Vyt, P., Maes, D., Sys, S. U., та et al. 2007. *Air contact influences the pH of extended porcine semen. Reprod. Dom. Anim.* V. 42. 218–220.

8. De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., та et al. 2006. *Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. Intern. J. of Androl.* V. 29, Is. 5. 543–552.

9. Denisjuk, P. V., та Martynenko N. A. 1995. *Principial'no novyj metod kul'tivirovanija doimplantacionnyh jembrionov mlekopitajushhih. Dokl. NAN Ukrainy*. № 11. 148 - 149 (in Ukrainian).

10. Denisjuk, P. V. 1997. Vpliv rN seredovishha na rozvitok in vitro doimplantacijnih embrioniv svini: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.13. Institut tvarinnictva UAAN. Harkiv. 25.

11. Korchan, N., ta Denysiuk, R. 2013. *Development of pig cumulus-oocyte complexes at constant and oscillating temperature and pH*. *Visn. Kiiv. nac. un. im. Tarasa Shevchenka. Biologija*. Kiiv: Vidavnicho-poligrafichnij centr «Kiiv's'kij universitet». Vip. 2 (64). 22 – 27 (in Ukrainian).

12. Korchan, N. O., i Denisjuk, P. V. 2011. Sposib kul'tivuvannja poza organizmom oocit-kumuljusznih kompleksiv (OKK) za temperaturi, osciljujuchoi z odnogodinnim periodom. Patent 62419 UA, MPK (2011.01), A01N63/00. Zajavnik Institut svinarstva im. O. V. Kvasnic'kogo NAAN Ukraïni. № u 2011 01851; zajavleno 17.02.2011; opublikovano 25.08.2011.

13. Cosson J. ATP: the sperm movement energizer. In Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. Kuestler E. and Traugott G. Editors. Nova Publisher Inc. 2013. P. 1 46. http://www.frov.jcu.cz/files/recentni_publicace/Cosson_Book_Chapter.pdf

14. Bjunning, Je. 1964. *Biologicheskie chasy*. M.: Mir. 11 – 26 (in Russian).

15. Denisjuk, P. V. 2017. *Dvoedinij konstrukt dialektichnoi logiki. Filosof's'ki obrri (Poltava)*. № 37. 68 – 77 (in Ukrainian).

Денисюк П. В., Князьева К. В. Изменение pH спермы хряка на протяжении сохранения её при осциллирующей температуре по сравнению с сохранением при постоянной

Изложено результаты сохранения жидкой спермы хряка при постоянной температуре сравнительно с её сохранением при температуре, осциллирующей биоритмично, в частности с одночасовым периодом.

Исследование проведено с помощью климат-контроль шкафа, который на протяжении всего периода сохранения спермы поочередно то выключали на тридцать минут, то включали на такое же время с помощью электронных таймеров, запрограммированных нами с этой целью. Для получения относительно постоянного температурного режима сохранения спермы использовали стеклянную банку объёмом в один литр. В качестве основного и наиболее объективного показателя влияния на сперму метода её сохранения выбрали pH, который изменялся от самого начала этого процесса. Теоретическое основание для выбора именно pH, как качественного-количественного показателя влияния на сохранение спермы метода его осуществления – гликолиз, как основной процесс снабжения спермиев энергией. Именно накопление конечного продукта гликолиза – молочной кислоты (лактата) – закисляет сперму.

Идеей этого исследования было показать, что сперма сохраняется при осциллирующей температуре лучше, чем при постоянной. Было предположено, что такой вывод можно сделать в том случае, если pH спермы, которая сохраняется при осциллирующей температуре, становится большим, чем pH спермы, которая сохраняется при постоянной температуре. Ведь это может свидетельствовать о том, что в осциллирующих условиях среды спермии используют меньше глюкозы на энергообеспечение своей жизнедеятельности.

И действительно, было обнаружено, что pH спермы, которая сохраняется при биоритмически осциллирующей температуре, стаёт большим такового спермы, которая сохраняется при постоянной температуре.

Наша работа позволяет преодолеть представление о том, что процесс сохранения спермы наилучше обеспечивается постоянными условиями среды. Можно предположить, что осциляция условий среды сохранения спермы обеспечивает взаимопереход противоположных процессов, без которого невозможно существование не только в обычных условиях среды, но и в условиях сохранения. Ключевые слова: сперма, хряк, сохранение, температура, pH, осциляция, биоритм.

Denysiuk P.V., Kniazieva K.V. pH change of boar sperm during its preservation at oscillating temperature in comparison with preservation it at constant one
Results of liquid boar sperm preservation at constant temperature in comparison with its preservation at biorhythmically oscillating temperature are presented. The research is done in climate control box, which was throughout all the time of sperm preservation turned off for 30 min and then turned on for 30 min and so on with the aid of electronic timer programmed by us for this purpose. A glass vessel of one liter volume was used in order to obtain relatively constant temperature regime for liquid sperm preservation. pH that changes since sperm is set for preservation was selected as a main and most objective indicator of influence on sperm by a method of its preservation. Theoretical ground for selection namely pH as a quantitative and qualitative indicator that the method of preservation exerts on sperm is glycolysis as a main process for supplying semen with energy. Namely accumulating of the glycolytic product - lactate – acidifies sperm. An idea of the research was to show that a sperm preserving at oscillating temperature is better than at constant one. We suggested this inference might be true in the case if sperm pH at oscillating temperature occurs bigger than pH of the sperm preserving at constant temperature. This may testify that spermatozoa use lesser glucose for supplying energy on maintaining vital activity at oscillating medium. Really, it was found that pH of sperm preserving at biorhythmically oscillating temperature, remains bigger than one of sperm preserving at constant temperature. Our work permits to overcome the idea that the process of sperm preservation is best of all ensured by medium with constant parameters. One may suppose that the oscillation of medium conditions for sperm preservation ensures passage of one contrary process into another without which the existence of sperm is impossible not only in ordinary medium conditions but also in the preserving one.
Key words: sperm, boar, preservation, temperature, pH, oscillation, biorhythm.