

УДК: 636.4:612.616:591.133.2

О. О. КОРБЕЦЬКА, аспірант.²

Інститут біології тварин НААН України, м. Львів

ВПЛИВ ДІАМЕТРУ СОЛОМИНОК ТА РЕЖИМУ РОЗМОРОЖУВАННЯ НА ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ КНУРІВ

У статті наведено результати досліджень з вивчення впливу різних діаметрів соломинок (2 мм, 2,8 мм, 5 мм і 7 мм) для кріоконсервації сперми кнурів на якість її деконсервації. Вивчено рівень ушкодження спермій за допомогою визначення активності фермента аспаратамінотрансферази (АсАТ), який дифундує при ушкодженнях клітин у середовище, що його оточує, а також активність спермій у деконсервованій спермі кнурів, їхню переживаність та стійкість їхніх мембран при тесті гіпоосмотичного набрякання спермій. Найнижчою активність АсАТ після деконсервації сперми кнурів була в середовищі при застосуванні соломинок з найменшим діаметром (2 і 2,8 мм) та температури розморожування 50°C протягом 12 с, що свідчить про краще збереження цілісності плазматичних мембран спермій при застосуванні даного поєднання діаметра соломинки і температури розморожування у порівнянні з іншими дослідними зразками.

Ключові слова: кнурі, сперма, спермії, кріоконсервація, деконсервація, упаковка, штучне осіменіння, активність, виживаність.

Застосування штучного осіменіння у свинарстві має високий генетичний та економічний потенціал, зберігання сперми при наднизьких температурах (-196 °C) та транспортування її на великі відстані залежить від реалізації можливостей закладених у методиці кріоконсервації сперми кнурів, про що і свідчить зарубіжний досвід високоякісного застосування у свинарстві деконсервованої сперми [1, 2, 3].

Упаковка сперми займає ключове значення в технології кріоконсервації сперми, особливо у кнурів, так як форма, діаметр і об'єм впливають на якість деконсервованої сперми. Крім того від упаковки залежить практичне застосування кріоконсервованої сперми кнурів у виробничих умовах. Режим розморожування тісно пов'язаний з фізичними параметрами соломинок, тому не можна вивчати ефективність використання різної упаковки без вивчення температури деконсервації [5, 6].

Для удосконаленого методу глибокого заморожування сперми кнурів необхідно встановити причини і механізми пошкодження клітин у процесі їх глибокого заморожування. Низькі температури викликають численні біологічні зміни в клітині. Глибоке замороження сперми кнурів сприяє витоку аспаратамінотрансферази (АсАТ) і інших ферментів із спермій у плазму [4, 5, 6]. Окремі моменти технологічної обробки сперми (розбавлення із середовищем) викликають втрату АсАТ [6, 8]. Спостерігається висока кореляція вмісту АсАТ у свіжоодержаних і заморожено-відталій спермі із заплідненістю свиноматок. Це послужило основою використання ступеня витоку ферментів із спермій як тесту пошкодження мембрани при технологічних маніпуляціях [7, 8, 9].

² Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук Шаран М.М.

Відповідно до вищенаведеного метою наших досліджень стало вивчення впливу діаметру соломинок для фасування сперми призначеної для кріоконсервації, температури її деконсервації на морфологічні та біохімічні показники якості спермій після розморожування.

Методика досліджень. Дослідження проводились в лабораторії фізіології і патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Сперма для досліджень відбиралась мануальним методом від чотирьох кнурів породи ландрас віком від двох до чотирьох років у ЛНВЦ „Західплемресурси”.

Заморожування сперми здійснювали в соломинках 0,25 мл, 0,5 мл, 2 мл, 4 мл (IMV, Франція) діаметром 2 мм, 2,8 мм, 5 мм і 7 мм відповідно на програмному заморожувачі Planer R204 (Великобританія). Еквілібрацію проводили при 5°C впродовж 120 хв. Відтавання проводили у водяній бані при 37°C впродовж 30 с, 50°C протягом 12 с та 70°C протягом 8 с. Відбирали зразки спермій для мікроскопії і плазми – для біохімічних досліджень після розбавлення середовищем, еквілібрації і розморожування. Для кріоконсервації сперми кнурів використовували середовище, розроблене у Всеросійському Інституті тваринництва [1, 5].

Активність спермій визначали нанесенням краплі сперми на попередньо підігріте предметне скло, накривали покривним скельцем і досліджували на підігрівному столику (з температурою 37°C) методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 (ЛОМО, СРСР) при збільшенні $\times 400$. Активність спермій виражали у відсотках спермій з прямолінійним поступальним рухом від загальної кількості.

Переживаність спермій поза організмом визначали шляхом їх інкубуванням у термостаті при температурі 37°C. Кожних 30 хв. оцінювали загальну рухливість спермій і підраховували час до повного припинення руху.

Для проведення тесту гіпоосмотичного набрякання спермій (ТГОНС) у пробірку вносили 10 мкл досліджуваної сперми і 100 мкл гіпотонічного розчину, перемішували і ставили в термостат при 37°C на 30 хв. Досліджували на фазово-контрастному мікроскопі при загальному збільшенні $\times 400$. Підраховували щонайменше 200 спермій, ділячи їх на дві групи: спермії із закрученими хвостами (з неушкодженими мембранами) і спермії з рівними хвостами (з ушкодженими мембранами), виражаючи другі у відсотках.

Активність АсАТ в плазмі/середовищі сперми визначали за допомогою набору для визначення аспартатамінотрансферази за методом Райтмана-Френкеля (ТОВ НВП „Філісіт Діагностика”, Україна) згідно з інструкцією виробника. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Sumal PE-2 (Carl Zeiss, Німеччина) в тестових планшетах (96 лунок), при довжині хвилі 515 нм.

Статистичну обробку даних здійснювали при допомозі пакету програм Statistica 7 (StatSoft, США).

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що найвища активність після деконсервації сперми замороженої у соломинки з діаметром 2,8 мм була при температурі розмороження 50°C і становила 75 % (табл.1). У той же час найнижча активність спостерігалась у соломинках діаметром 7 мм при найменшій швидкості розморожування 37°C. Деконсервація сперми у соломинках діаметром 2 і 2,8 мм при 70°C показали вірогідно нижчу активність ($p < 0,05$) після деконсервації у порівнянні з іншими режимами і становило відповідно 43 і 55 %.

Таблиця 1

Активність спермійів при різних діаметрах соломінок та температурах деконсервації, %, $M \pm m$, $n=8$, $p<0,05$

Діаметр соломінок, мм	Температури деконсервації		
	37°C	50 °C	70°C
2	60±1,2	65±2,1	43±2,2
2,8	64±2,5	75±2,6	55±1,4
5	49±1,7	55±3,1	60±2,8
7	40±1,6	50±2,9	50±2,7

Спермії, заморожені у соломінках діаметром 2,8 мм показали найвищі результати переживаності при температурі розморожування 50°C і становили близько 8 год (табл.2). Спермії, які були заморожені у соломінках діаметром 7 мм показали найнижчі результати переживаності і становили 4 год при 37°C, дещо зріс час переживання спермійів поза організмом при 50°C до 5 год. і знизився при 70°C, але не на вірогідну величину. Переживаність спермійів, заморожених у соломінках 2 мм, залишилась незмінною при 37 і 50°C і становила 5 год. ($p<0,05$) що вірогідно знизилась при температурі 70°C і становило 4 год.

Таблиця 2

Переживаність спермійів при різних діаметрах соломінок та температурах деконсервації, год, $M \pm m$, $n=8$, $p<0,05$

Діаметр соломінок, мм	Температури деконсервації		
	37°C	50°C	70°C
2	5,17±1,7	5,17±2,1	4,3±2,1
2,8	6,17±1,4	7,67±2,9	5,45±2,5
5	4,7±2,1	5,8±1,8	5,5±2,6
7	4±0,9	5,33±2,3	5,02±1,9

Кількість спермійів з неушкодженими плазматичними мембранами, замороженими у соломінках діаметром 2 і 5 мм, залишалась постійною при всіх досліджуваних температурах і становила в середньому 57 і 68 % відповідно (табл.3). Застосування соломінок з діаметром 2,8 мм показало достовірно кращі результати щодо інших діаметрів тільки при температурі 37 і 50°C. Найнижчі результати спостерігались при використанні соломінок діаметром 7 мм, у яких спермії зазнали найбільшого ушкодження цитоплазматичної мембрани при всіх досліджуваних температурах деконсервації і становили близько 80 % ушкоджених спермійів за температури 37 і 50 °C і дещо покращились результати при 70 °C.

Таблиця 3

Цілісність плазматичних мембран спермійів (ТГОНС), при різних діаметрах соломінок та температурах реконсервації, %, $M \pm m$, $n=8$, $p<0,05$

Діаметр соломінок, мм	Температури деконсервації		
	37°C	50°C	70°C
2	59,7±2,8	57,2±2,1	60,3±3,2
2,8	55,6±2,6	45,1±3,1	61,3±2,8
5	67,6±3,5	66,2±2,6	68,7±3,3
7	82,4±3,9	80,3±4,1	72,4±2,1

Активності дифундової із сперміїв у середовище АсАТ не показали вірогідних різниць між зразками сперми кнурів, замороженої у соломинках з діаметром 2 і 2,8 мм при температурах деконсервації 37 і 50°C, але показали достовірно нижчу активність фермента по відношенню до сперми, яка була заморожена у соломинках діаметрами 5 і 7 мм. Проте, активність АсАТ у середовищі після розмороження сперми кнурів при 50°C, яка була заморожена у соломинках з діаметром 2,8 мм була на 14,8 % нижчою у порівнянні з спермою замороженою у соломинках з аналогічним діаметром, але розмороженою при температурі 37 °C, та на 24,6% нижчою від сперми, яка зберігалася у соломинках з аналогічним діаметром і розморожувалась при температурі 70°C.

Таблиця 4

Активність дифундової АсАТ при різних діаметрах соломінок та температурах деконсервації мкмоль/(год x 10⁸), M± m, n=8, p<0,05

Діаметр соломінок, мм	Температури деконсервації		
	37°C	50°C	70°C
2	61,03±2,7	48,27±2,1	76,07±4,3
2,8	54,44±4,08	46,18±2,8	61,13±2,8
5	78,75±3,8	80±4,6	78,69±3,4
7	89,69±2,7	78,75±4,3	70,5±4,2

При температурі розморожування 70°C не було отримано достовірної різниці активності ферментів між всіма досліджуваними діаметрами, що свідчить про значий ушкоджувальний вплив швидкого режиму розморожування на мітохондрії сперміїв кнура.

Висновки

1. Найбільш ефективним для заморожування сперми кнура є діаметр соломінок 2,8 мм у порівнянні з діаметрами 2 мм, 5 мм і 7 мм.

2. Оптимальними режимами деконсервації сперми кнура є температура 37° С з експозицією 30 с та температура 50° С протягом 12 с при застосуванні соломінок діаметром 2 і 2,8 мм.

3. Найнижчою активність АсАТ після деконсервації сперми кнурів була при застосуванні соломінок з найменшим діаметром (2 і 2,8 мм) та температури розморожування 50° С, що свідчить про краще збереження цілісності плазматичних мембран сперміїв при застосуванні даного поєднання діаметра соломінки і температури розмороження у порівнянні з іншими дослідними зразками.

4. Застосування соломінок з діаметрами 5 і 7 мм, незважаючи на їхню перспективну практичну можливість заморожувати «1 дозу в 1 соломинці» не показало своєї ефективності у збереженні функціональних і морфологічних показників сперміїв кнурів після деконсервації.

Перспективи подальших досліджень. На основі проведених експериментів перспективними будуть дослідження з вивчення взаємозв'язку між запліднюваністю свиноматок і досліджуваних діаметрів соломінок для заморожування сперми кнура.

Список використаної літератури

1. Ескин Г. В. Теория и практика искусственного осеменения свиней свежезвзятой и замороженной спермой / Г. В. Ескин., А. Г.Нарижный., Г. С. Походня // Монография . – Белгород : Везелица, –2007. –253 с.
2. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев, –1991. –198с.
3. Кононов В. Среды для замораживания спермы / В. Кононов., Н. Голышев., Э.Хачапуридзе // Свиноводство. – 1975.- вып 11. С –25-26.
4. Курбатов А. Д. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных / А.Д.Курбатов., Е.В.Платов., Н.В.Корбан., Л.Г.Мороз., В.А. Наук., и др. // – Л.: Агропромиздат Ленингр. отд-ние, –1988. – 256с.
5. Антонюк В. С. Взаимосвязь физиологических функций и биохимических свойств спермы хряков / В. С. Антонюк // Автореф. дис. д-ра биол. наук. – Харьков, – 1984. – С.49.
6. Eriksson B. M. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat-Packs and Maxi-straws. him / B. M. Eriksson, and Rodriguez-Martinez // Reprod. Sci. –2000–: 63: –205-220.
7. Bwanga C. O. “Cryopreservation of boar semen ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing” / C. O. Bwanga, H. Ekwall, H. Rodriguez-Martinez // Acta Veterinaria Scandinavica, vol. 32, no. 4, –1991. – pp. –463–471.
8. Weitze K. F. “New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes” / K. F. Weitze, D. Rath, and G. Baron // Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, vol. 94, no. 8, –1987. –pp. 485–488.
9. Mwanza A. “Post-thaw motility, acrosome morphology and fertility of deep frozen boar semen packaged in plastic PVC-bags” / A. Mwanza and H. Rodriguez-Martinez // Biomedical Research, vol. 4, –1993. –pp. 21–29.

ВЛИЯНИЕ ДИАМЕТРА СОЛОМИНОК И РЕЖИМА РАЗМОРАЖИВАНИЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ХРЯКОВ/ О.О. Корбецька

В статье приведены результаты исследований по изучению влияния различных диаметров соломинок (2 мм, 2,8 мм, 5мм и 7мм) для криоконсервации спермы хряков на качество её после деконсервации. Изучено уровень повреждения спермиев с помощью определения активности фермента аспаратаминоминотрансферазы (АсАТ), диффундирующего при повреждениях клеток в среду, которая его окружает, а также активность спермиев в деконсервированной сперме хряков, переживанность и устойчивость их мембран при тесте гипосмотического набухания спермиев. Самой низкой активностью АсАТ после деконсервации спермы хряков была в среде при применение соломинок с наименьшим диаметром (2 и 2,8мм) и температуры размораживания 50°С в течение 12 с, что свидетельствует о лучшем сохранении целостности плазматических мембран спермиев при применение данного сочетания диаметра соломинки и температуры размораживания по сравнению с другими опытными образцами.

Ключевые слова: хряки, сперма, спермии, криоконсервация, деконсервация, упаковка, искусственное осеменение, активность, выживаемость.

Рецензент – доктор сільськогосподарських наук Д. Д. Остапів