

ВПЛИВ ФАСУВАННЯ І ВУГЛЕВОДІВ НА ВИЖИВАНІСТЬ РОЗБАВЛЕНОЇ СПЕРМИ БАРАНІВ

І. В. Лобачова
LIV-e@rambler.ru

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова
“Асканія-Нова” – Національний науковий селекційно-генетичний
центр з вівчарства
вул. Червоноармійська, 1, смт Асканія-Нова, Чаплінський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна

Досліджували залежність виживаності сперми баранів за температури 37 °С від типу фасування (пайети або флакони) та вмісту у розчині вуглеводів. При розведенні сперми 2,9%-ним розчином цитрату натрію витримка у пайетах вірогідно зменшувала показники виживаності і абсолютної виживаності, порівняно із витримкою у флаконах – $2,30 \pm 0,08$ і $7,51 \pm 0,56$ проти $2,97 \pm 0,17$ год. і $9,80 \pm 0,64$ ум. од. За доповнення розчину лактозою та глюкозою (по 0,01 М) показники виживаності та абсолютної виживаності сперми, фасованої у пайети, були вірогідно більшими за показники сперми у флаконах, $5,33 \pm 0,12$ і $22,88 \pm 0,96$ проти $3,46 \pm 0,62$ год. і $9,21 \pm 1,52$ ум. од. Додавання до розчину лише лактози збільшувало виживаність і абсолютну виживаність сперми порівняно із результатами витримки у розчині цитрату натрію, але не змінювало характер залежності показників від типу фасування. При заміні лактози глюкозою залежність фізіологічних показників від типу фасування змінювалась на протилежну – виживаність ($p > 0,05$) та абсолютна виживаність ($p < 0,05$) були більшими в зразках, фасованих у пайети – $7,92 \pm 0,35$ і $24,63 \pm 2,30$ проти $4,96 \pm 1,30$ год. і $10,68 \pm 2,41$ ум. од. Аналіз результатів показав, що за анаеробних умов спермії використовують як джерело енергії глюкозу. За вільного доступу кисню утилізація глюкози пригнічується і спермії утилізують інші субстрати, зокрема, лактозу. Планується використати виявлений позитивний вплив глюкози для підвищення ефективності глибокого заморожування сперми баранів у пайетах.

Ключові слова: баран, сперма, виживаність, абсолютна виживаність, глюкоза, лактоза.

THE INFLUENCE of the TYPE of PACKING and CARBOHYDRATES on SURVIVAL RATE of DILUTED RAM SPERM

I. V. Lobachova
LIV-e@rambler.ru

Ascania Nova Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions
named after M. F. Ivanov - National Scientific Selection-Genetics
Center for Sheep Breeding
Chervonoarmiyska Street, 1, Ascania Nova, Chaplinka district, Kherson
region, 75230, Ukraine

It was investigated dependence of the survival rate of sperm at a temperature 37 °C from the type of packing (straw or glass vial) and content of carbohydrates in solution. At dilution of sperm by 2,9% sodium citrate the incubation in straws significantly diminished the survival rate and the total survival rate by comparison with vials – $2,30 \pm 0,08$ and $7,51 \pm 0,56$ against $2,97 \pm 0,17$ h and a $9,80 \pm 0,64$ arb. un. For addition in solution a lactose and glucose (0,01 M for both) the survival rate and the total survival rate of sperm packaged in straws were reliably more than indexes of sperm packed in vials – $5,33 \pm 0,12$ and $22,88 \pm 0,96$ against $3,46 \pm 0,62$ h and a $9,21 \pm 1,52$ arb. un. Addition to solution only of lactose increased the survival rate and the total survival rate of sperm by comparison with the results of incubation in 2,9% sodium citrate only, but did not change character of dependence of indexes from the type of packing. At replacement of lactose by glucose the dependence of physiology indexes from the type of packing changed on opposite - the survival rate ($p > 0,05$) and the total survival rate ($p < 0,05$) were higher in samples packaged in straws - $7,92 \pm 0,35$ and $24,63 \pm 2,30$ against $4,96 \pm 1,30$ h. and $10,68 \pm 2,41$ arb. un. Analysis of the results showed that under anaerobic conditions sperm use glucose as an energy source. For free access of oxygen the utilization of glucose is suppressed and sperm utilizes other substrates, for example, lactose. It is planned to use the found positive effect of glucose to increase of the efficiency of sheep sperm freezing in straws.

Keywords: ram, sperm, survival rate, total survival rate, glucose, lactose.

ВЛИЯНИЕ ФАСОВКИ И УГЛЕВОДОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ РАЗБАВЛЕННОЙ СПЕРМЫ БАРАНОВ

И. В. Лобачева
LIV-e@rambler.ru

Институт животноводства степных районов имени М. Ф. Иванова
"Аскания-Нова" – Национальный научный селекционно-
генетический центр по овцеводству
ул. Красноармейская, 1, пгт Аскания-Нова, Чаплинский р-н,
Херсонская обл., 75230, Украина

Исследовали зависимость выживаемости спермы баранов при температуре 37 °С от типа фасовки (пайетты или флаконы) и содержания в растворе углеводов. При разведении спермы 2,9%-ным раствором цитрата натрия выдержка в пайеттах достоверно уменьшала показатели выживаемости и абсолютной выживаемости в сравнении с выдержкой во флаконах – 2,30±0,08 и 7,51±0,56 против 2,97±0,17 час. и 9,80±0,64 усл. ед. При дополнении раствора лактозой и глюкозой (по 0,01 М) показатели выживаемости и абсолютной выживаемости спермы, фасованной в пайетты, были достоверно больше показателей спермы во флаконах – 5,33±0,12 и 22,88±0,96 против 3,46±0,62 час. и 9,21±1,52 усл. ед. Внесение в раствор только лактозы увеличивало выживаемость и абсолютную выживаемость в сравнении с результатами выдержки в растворе цитрата натрия, но не изменяло характер зависимости от типа фасовки. При замене лактозы глюкозой зависимость физиологических показателей менялась на противоположную – выживаемость ($p>0,05$) и абсолютная выживаемость ($p<0,05$) были большими в образцах, фасованных в пайетты, – 7,92±0,35 и 24,63±2,30 против 4,96±1,30 час. и 10,68±2,41 усл. ед. Анализ результатов показал, что в анаэробных условиях спермии используют как источник энергии глюкозу. При свободном доступе воздуха утилизация глюкозы подавляется и спермии утилизируют другие субстраты, в частности, лактозу. Планируется использовать выявленное положительное влияние глюкозы для повышения эффективности глубокого замораживания спермы баранов в пайеттах.

Ключевые слова: баран, сперма, выживаемость, абсолютная выживаемость, глюкоза, лактоза.

Використання заморожено-розмороженої сперми при штучному осіменінні овець поширює перспективи селекції у вівчарстві. Результативність осіменіння кріоконсервованою спермою залежить від технології її заморожування, якості підготовки та породи тварин. Оптимізація складу розбавлювачів, температурних режимів заморожування-розморожування дозволила досягти 50–60%-ного запліднення вівцематок [1, 2]. Роботи з вдосконалення методики заморожування сперми тривають.

За аналізом попередніх досліджень припущено, що одним з чинників, який може впливати на результати кріоконсервації сперми, є доступність кисню до середовища зі сперміями під час еквілібрації і, відповідно, відмінність шляхів енергетичного живлення сперміїв. Метою дослідження було визначити виживаність сперми баранів, яку після розбавлення фасували у пайети або скляні флакони та витримували за температури 37 °С, а також вивчити вплив доповнення розчинів річними типами енергетичних речовин.

Матеріал та методика досліджень. Дослідження проведено на початку анестрального сезону (квітень-травень) 5 дослідями за принципом поділених еякулятів. У кожному досліді використано еякуляти від шістьох дорослих баранів-плідників, яких утримували на звичайному раціоні. Відразу після одержання еякулят оцінювали за об'ємом, активністю і концентрацією сперміїв. Після цього 0,05 мл нативної сперми вносили у скляний пеніциліновий флакон з 1 мл дослідного розчину. Не пізніше 3 хвилин після розбавлення 0,5 мл розчину зі спермою фасували у 2 пайети (по 0,25 мл), решту залишали у флаконі. Пайети герметизували пластмасовими кульками, флакон закривали гумовою кришкою. Усі ємкості переносили у термостат і витримували за температури 35–37 °С. Активність сперми визначали через кожну годину до повного припинення руху клітин. Виживаність (год.) і абсолютну виживаність (ум. од.) розбавленої нативної сперми вираховували відповідно до ГОСТ 20909-4.

Як розбавлювачі використано:

– у досліді 1 – 2,9%-ний розчин цитрату натрію 5,5-водного тричізаміщеного (0,081 М) без добавок;

– у досліді 2 – цитрат натрію (0,066 М) з додаванням лактози (0,01 М), глюкози (0,01 М) і антибіотиків (суміш 1:1 пеніциліну і стрептоміцину, 0,01 мг/мл);

– у досліді 3 – цитрат натрію (0,074 М) з додаванням лактози (0,01 М) і антибіотиків (0,01 мг/мл); цитрат натрію (0,0761 М) з глюкози (0,01 М) і антибіотиків (0,01 мг/мл);

– у досліді 4 – цитрат натрію (0,074 М) з додаванням лактози (0,01 М) і антибіотиків (0,01 мг/мл); 2,9%-ний розчин цитрату натрію з додаванням і антибіотиків (0,01 мг/мл); 2,9%-ний розчин цитрату натрію без добавок;

– у досліді 5 – цитрат натрію (0,074 М) з додаванням глюкози (0,01 М) і антибіотиків (0,1 мг/мл); цитрат натрію (0,074 М) з додаванням глюкози (0,01 М); 2,9%-ний розчин цитрату натрію з додаванням і антибіотиків (0,1 мг/мл); 2,9%-ний розчин цитрату натрію без добавок.

При перевірці активності сперми, фасованої у пайєти, кінчик із кулькою відкидали, а для тесту відокремлювали 1–1,5 см з кінця пайєти. Залишок пайєти повторно герметизували кулькою.

Результати досліджень. Результати подано у часовому порядку проведення дослідів. При розведенні сперми 2,9%-ним розчином цитрату натрію витримка у пайєтах вірогідно зменшувала показники виживаності і абсолютної виживаності, порівняно із витримкою у флаконах (табл., вар. 1 і 2). При цьому активність сперми, фасованої у пайєти, протягом усього процесу витримки була менша за аналогічні показники зразків у флаконах (рис. 1). За доповнення розчину цитрату натрію лактозою і глюкозою показники виживаності ($p < 0,05$) і абсолютної виживаності ($p < 0,05$) сперми, фасованої у пайєти, були вірогідно більшими за показники сперми у флаконах (вар. 3 і 4). При цьому доповнення розчину вуглеводами зменшувало падіння активності сперми у першу годину витримки і сприяло збереженню її на рівні 4–5 балів протягом наступних двох годин (рис. 2).

Для уточнення особливостей дії зазначених вуглеводів, проведено дослід 3, в якому лактозу і глюкозу додавали до розчинів цитрату натрію поодиночі. Додавання лактози збільшувало виживаність і абсолютну виживаність сперми порівняно із результатами досліді 1 (вар. 5 і 6), що свідчить про використання сперміями лактози як енергетичного субстрату. Разом з тим, додавання лактози не змінювало характер залежності показників від типу фасування. При заміні лактози глюкозою залежність фізіологічних показників від типу фасування змінювалась на протилежну – виживаність ($p > 0,05$) та абсолютна виживаність ($p < 0,05$) були більшими в зразках, фасованих у пайєти (вар. 7 і 8). Крім того, хоча показники сперми, яку витримували у флаконі, були кращими за результати досліді 1, активність протягом усієї процедури культивування залишалася нижчою за показники зразків, до яких додавали лактозу. Це може свідчити про те, що в аеробних умовах використання сперміями глюкози пригнічується.

Цікаво, що після 4–5 годин витримки активність сперми, розбавленою розчином із лактозою і фасованої у флакони, трохи підвищувалась (рис. 3). Подібне підвищення активності сперми відмічалося нами в інших дослідіах. Припускаємо, що к цьому часу в сперміях максимально активізуються ферменти ланцюга дихання.

Отже, за анаеробних умов спермії використовують як джерело

енергії глюкозу. За вільного доступу кисню утилізація глюкози пригнічується і спермії використовують інші субстрати, зокрема, лактозу.

Таблиця. Вживаність і абсолютна вживаність розбавленої свіжоотриманої сперми при витримці за 37 °С

№	Розчин	Ф З	n (N)	Показники сперми		
				активність, б	вживаність, год.	абс. вживаність, ум. од.
Дослід 1						
1	цитрат натрію	ф	16 (3)	8,2±0,3	3,0±0,2 ^a	9,8±0,6 ^a
2		п	32 (3)		2,3±0,1 ^b	7,5±0,6 ^b
Дослід 2						
3	цитрат натрію + лактоза +глюкоза+а/б	ф	6 (1)	9,3±0,4	3,5±0,6 ^a	9,2±1,5 ^a
4		п	6 (1)		5,3±0,1 ^b	22,9±1,0 ^b
Дослід 3						
5	цитрат натрію + лактоза +а/б	ф	6 (1)	9,0±0,4	7,7±0,8 ^{a,c}	16,3±1,8 ^a
6		п	12 (1)		5,2±0,2 ^b	13,6±0,9 ^a
7	цитрат натрію + глюкоза+а/б	ф	6 (1)		5,0±1,3 ^{a,b}	10,7±2,4 ^a
8		п	12 (1)		7,9±0,4 ^a	24,6±2,3 ^b
Дослід 4						
9	цитрат натрію + лактоза +а/б	ф	6 (1)	8,8±0,3	7,2±0,7 ^a	18,9±4,4 ^a
10	цитрат натрію+а/б	ф	6 (1)		4,0±0,7 ^b	13,7±2,7 ^a
11	цитрат натрію	ф	6 (1)		3,4±0,5 ^b	12,7±2,1 ^a
Дослід 5						
12	цитрат натрію + глюкоза+а/б	ф	6 (1)	9,3±0,4	5,5±1,1 ^a	18,1±2,4 ^a
13	цитрат натрію+ глюкоза	ф	6 (1)		5,6±1,1 ^a	18,2±3,0 ^a
14	цитрат натрію +а/б	ф	6 (1)		3,5±0,6 ^a	8,9±1,3 ^b
15	цитрат натрію	ф	6 (1)		3,3±0,5 ^a	10,3±1,9 ^b

Примітка. Тут і далі показники в одній колонці з різними субскриптами різняться між собою з вірогідністю більш ніж 95 % (P>0,95, або p<0,05); n – кількість досліджених зразків, N – кількість повторів; ФЗ – форма зберігання: ф – флакон, п– пайета.

Оскільки нативна сперма містить певну кількість мікроорганізмів, які здатні утилізувати вуглеводи і внаслідок цього порушувати рН середовища, одними із компонентів розчинів у дослідях 2 і 3 були антибіотики пеніцилін і стрептоміцин (1:1), які додавали у загальній концентрації 0,01 мг/мл. Для визначення чи не могли антибіотики стати причиною різниці між результатами дослідів 1, 2 і 3, проведено експерименти 4 і 5.

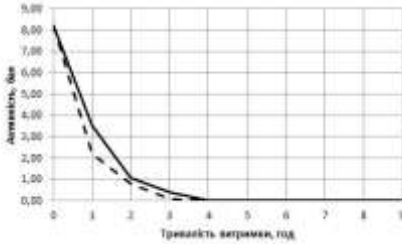


Рис. 1. Дослід 1.
Зміна активності сперми у розчині цитрату натрію без антибіотиків фасованої у флакони (—) або пайети (- -).

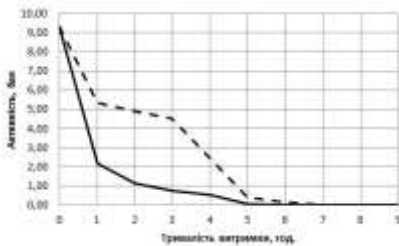


Рис. 2. Дослід 2.
Зміна активності сперми у розчині цитрату натрію з додаванням лактози, глюкози і а/б фасованої у флакони (—) або пайети (- -).

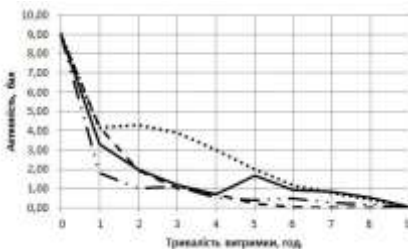


Рис. 3. Дослід 3.
Зміна активності сперми у розчині цитрату натрію з додаванням лактози і а/б та фасованої у флакони (—) або пайети (- -), або з додаванням глюкози і а/б та фасованої у флакони (— · · —) або пайети (·····).

Додавання антибіотиків до розчину цитрату натрію лише трохи ($p > 0,05$) покращило показники виживаності розбавленої сперми (вар. 10 і 11, 14 і 15) і майже не вплинуло на зміну її активності в процесі витримки (рис. 4 і 5).

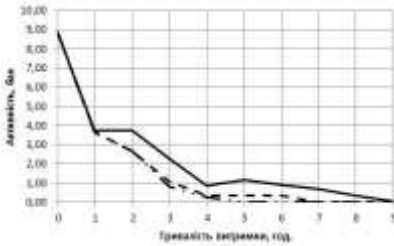


Рис. 4. Дослід 4.
Зміна активності сперми, фасованої у флакони, у розчинах: цитрату натрію з лактозою і а/б (—), цитрату натрію з а/б (- - -), цитрату натрію без добавок (- · · —).

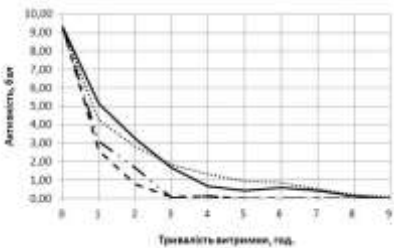


Рис. 5. Дослід 5.
Зміна активності сперми, фасованої у флакони, у розчинах: цитрату натрію з глюкозою і а/б (—), цитрату натрію з глюкозою (·····), цитрату натрію з а/б (- - -), цитрату натрію без добавок (- · · —).

Додаткове внесення лактози вірогідно збільшувало виживаність сперміїв, а додавання глюкози – абсолютну виживаність. Відсутність суттєвої різниці для розчину, доповненому глюкозою, між зразками з антибіотиками і без них свідчить, що мікроорганізми не оказували значимого впливу на виживаність сперми, і, отже, причиною відмінності показників є саме утилізація вуглеводів.

Порівняння результатів дослідів 3 і 5 показало різницю за абсолютною виживаністю сперми, розбавленою розчином із глюкозою і антибіотиками та фасованої у флакони, – $10,68 \pm 2,41$ проти $18,08 \pm 2,40$ ум. од. (вар. 7 і 12, $p > 0,05$, $t_d = 2,18$). Оскільки у цих дослідях використано одних і тих самих тварин, чи могла причиною спостереженої відмінності стати те, що к часу досліді 5 тварини вже якийсь час використовувалися, а, отже, могло відбутися певне стимулювання їх сперматогенезу? Для відповіді на це питання порівняли дані, що отримували лише від тих тварин, яких було залучено в усіх досліді (4 голови). Зокрема, аналізовано виживаність сперми, яку розбавляли розчином цитрату натрію без додатків і фасували у флакони. Середній показник виживаності на час отримання перших еякулятів становив $3,25 \pm 0,17$ год., абсолютної виживаності – $9,35 \pm 0,64$ ум. од. Аналогічні показники у час досліді 4 становили $3,44 \pm 0,73$ і $13,24 \pm 3,33$, досліді 5 – $3,13 \pm 0,63$ год. та $8,34 \pm 2,29$ ум. од. відповідно. Тож, виживаність зразків сперми, розбавленої розчином цитрату натрію і фасованої у флакони, протягом використання плідників дещо змінювалася, але невірогідно,

що, проте, не виключає ймовірності зміни активності окремих ланцюгів метаболізму сперміїв.

Висновки: 1. Тип фасування і доданих вуглеводів впливають на виживаність розбавленої сперми баранів при витримці за 37 °С.

2. При фасуванні у пайєти сперми, розбавленої розчином цитратом натрію, позитивний вплив на її наступну виживаність справляє додавання 0,01 М глюкози. За витримки розбавленої сперми у скляних флаконах позитивний вплив глюкози на виживаність сперми баранів пригнічується.

3. Доповнення розчину цитрату натрію лактозою (0,01 М) справляє позитивний вплив на виживаність розбавленої сперми за витримки її, фасованою у скляні флакони. За фасування сперми у пайєти позитивний вплив лактози зникає.

Перспектива подальших досліджень. Планується використати виявлений позитивний вплив глюкози для підвищення ефективності глибокого заморожування сперми баранів у пайєтах.

Список використаної літератури

1. Айбазов М. М. Влияние технологии замораживания на биологическую полноценность спермы баранов / М. М. Айбазов, П. В. Аксенова, И. Г. Сердюков // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. – № 4. – С. 9–10.

2. Paulenz H. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen / H. Paulenz, T. Adnøy, L. Söderquist // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2007. – Vol. 49. P. 26–33.