

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ НА ЯКІСТЬ РОЗМОРОЖЕНОЇ СПЕРМИ КНУРІВ

О. Б. Андрушко, С. Б. Корнят, М. М. Шаран

Інститут біології тварин НААН

Досліджено виживаність спермій та їх запліднюючу здатність після відтаювання при різних режимах заморожування сперми кнурів. Встановлено позитивний вплив короткотривалої витримки сперми у морозильній камері перед зануренням у рідкий азот при її заморожуванні, що покращує якість розмороженої сперми та загальну активність і виживаність спермій після деконсервації.

З'ясування механізму дії температурного фактору на клітини почалось ще в 50-тих роках минулого століття, коли було запропоновано цілу низку теорій пошкодження клітин за дії окремих факторів при охолодженні. На сьогодні технологія заморожування сперми удосконалена для багатьох видів тварин [1]. Однак її застосування у галузі свинарства, внаслідок низької результативності штучного осіменіння потребує подальшого вивчення, що зумовлено збереженням функціональної активності та рухомості спермія, яка гальмує його властивість до запліднення.

При заморожуванні та відтаванні порушується важливі для процесу запліднювання структури, що є менш стійкими ніж компоненти спермія. Дослідженнями [2, 3] встановлено, що зовнішня плазматична мембрана спермія є найбільш тонкою у полі зору мікроскопа та найменш стійкою структурою спермія, яка при зміні концентрації речовин в оточуючому середовищі викликає її порушення або повне знищення. Друга за чутливістю до адекватних змін до зовнішнього середовища є акросома, зокрема її зовнішня мембрана. Акросома кнура за однакових умов у порівнянні з акросомою спермій бугая підлягає кріогенному ушкодженню у значно більшій мірі, що має особливе значення на початкових етапах запліднення. Спермії кнурів на відміну від сперматозоїдів інших видів тварин характеризуються дуже низькою переживаністю в умовах *in vitro*. Процес заморожування-відтавання сперми кнурів викликає різке скорочення часу переживаності спермій [4–6]. На цій основі загальними критеріями при розробці методів зберігання сперми кнурів прийнято рівень запліднення та народження молодняку [7].

Метою проведених досліджень було вивчити виживаність спермій та їх запліднюючу здатність після відтавання при різних режимах заморожування сперми кнурів для розробки покращеного варіанту кріоконсервування сперми цього виду тварин.

Матеріали і методи. Сперму від кнурів-плідників великої білої породи, віком 2–4 роки, умови утримання яких відповідали загальним положенням інструкції штучного осіменіння свиней, отримували мануальним способом. Для досліджень відбирали сперму другої (спермонасиченої) фракції у якій міститься до 80 % загальної кількості спермій. Подальші експерименти проводили за основною схемою біотехнологічної обробки сперми при кріоконсервуванні: інкубація, розбавлення, еквілібрація, заморожування та відтавання. Якість сперми оцінювали до кріоконсервації та після її розморожування за різних температурних режимів у відповідності загальноприйнятими методиками [8].

Одногодинну інкубацію сперми після її отримання проводили для стабілізації структури спермій та їх стійкості до впливу зовнішнього середовища за рахунок біологічно активних речовин плазматичних мембран сім'яної плазми.

Розбавляли сперму у розбавнику у співвідношенні 1:1 за рецептом Всеросійського Інституту тварин, склад якого наведений у таблиці 1

Таблиця 1

Синтетичне середовище для заморожування сперми кнурів

Компоненти	Кількість
Сахароза, г	60
Глюкоза медична безводна, г	16
Триамоній цитрат, г	5
Трилон Б, хелатон – 3, г	8
Оксид кальцію, г	0,6
Оксид магнію, г	0,4
Гідроксид натрію, г	0,3
Гідроксид калію, г	0,1
Гентаміцин, г	0,3-0,6
Гліцерин, см ³	40
Жовток курячих яєць, см ³	50
Вода дистильована, см ³	1000

Еквілібрацію попередньо розбавленої сперми з метою підвищення стійкості спермій до охолодження, внаслідок перебудови внутрішньоклітинних структур, проводили протягом однієї години при температурі 5 °С у холодильній камері.

Згодом сперму заморожували на фторопластових пластинах у теплоізольованій ванні із необхідним рівнем рідкого азоту. Для досягнення температури мінус 50–120 °С пластини витримували у морозильній камері 1 хв. В лунки фторопластової пластини вносили по 0,25 см³ розбавленої сперми. Після заповнення чарунок пластину занурювали у ванну з рідким азотом відразу та через 10 і 20 секунд витримки у парах азоту та охолоджували до припинення його кипіння.

Утворені гранули замороженої сперми, після триденного зберігання в азоті, розморожували при температурі 38 °С у термостаті, із подальшим проведенням мікроскопічної оцінки якості сперми.

Результати й обговорення. На рисунку 1 представлено дані загальної активності зразків сперми кнурів за різних умов кріоконсервування та відносний вміст спермій із прямолінійно-поступальним рухом (ППР) при підготовці до заморожування.

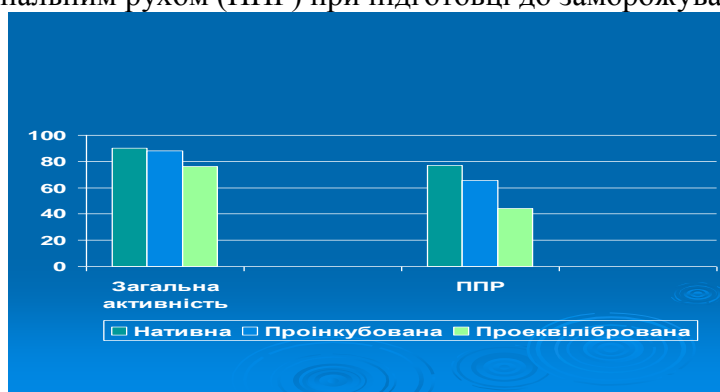


Рис. 1. Загальна активність та вміст спермій з прямолінійно-поступальним рухом при підготовці до заморожування

Як видно з представленого рисунку отримані результати свідчать про те, що окремі технологічні маніпуляції із спермою проведені після її взяття до заморожування (інкубація, еквілібрація) погіршують фізіологічний стан спермій, що є закономірним явищем. При цьому слід зауважити, що процес інкубування сперми є менш вразливим для статевих клітин ніж еквілібрація або поступове охолодження у холодильній камері. Так, після триденного зберігання сперми у рідкому азоті з подальшим її розморожуванням при температурі 38°С та

інкубуванням через 1, 2 і 3 години, час витримки зразків сперми у парах азоту перед зануренням в азот відразу (контрольна група), через 10 секунд (1 дослідна група) та 20 секунд (2 дослідна група) впливає на загальну активність. Це є позитивним моментом у зразках сперми дослідних груп, особливо у 2 дослідній групі (рис. 2).

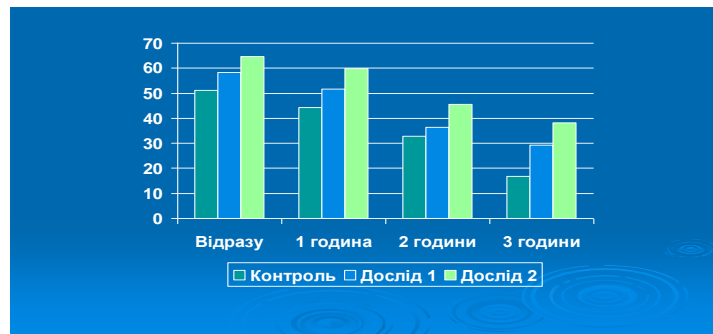


Рис. 2. Загальна активність розмороженої при 38 °С сперми кнурів контрольної і дослідних груп протягом трьох годин інкубування

Аналогічну закономірність за результатами досліджень спостерігали і за вмістом спермій з ППР (рис. 3). Відразу після розморожування та на протязі 3 годин інкубування в термостаті у зразках дослідних груп відсоток спермій з ППР був вищим ніж в контрольній групі.



Рис. 3. Вміст спермій з прямолінійно-поступальним рухом у зразках сперми кнурів після її розмороження при 38 °С

Таким чином, з отриманих даних видно, що інкубація сперми кнурів при кімнатній температурі не особливо впливала на активність спермій та їх вміст у зразках з ППР (2,43 та 11,65 %, відповідно). Після проведення еквілібрації дані показники знижувались на 14,17 та 32, 84 %, у порівнянні із свіжоотриманими еякулятами кнурів, що свідчить про значний вплив охолодження на життєздатність спермії кнура.

Аналізуючи результати досліджень за активністю розмороженої сперми кнурів відразу після розмороження у всіх трьох варіантах досліді вона була на 39,15-25,65% нижчою у порівнянні із свіжо отриманою спермою. Також необхідно зазначити, що у третьому дослідному варіанті активність сперми була найвищою, а у другому зразку займала проміжне положення. Вміст спермій із ППР у розмороженій спермі кнурів був меншим на 48,19–25,06 %, порівняно із свіжо отриманою. Даний показник мав найвище значення також у третій дослідній групі, що свідчить про позитивний вплив короткотривалої (20 секунд) витримки сперми у парах азоту перед її безпосереднім зануренням у рідкий азот при заморожуванні. З наведених на рисунках 2, 3 даних видно, наскільки знижується активність розмороженої сперми кнурів за час інкубації при температурі 38 °С. Активність сперми та вміст у зразках спермій з ППР в другій і третій дослідних групах були вищими порівняно з

першою (контрольною) групою. Відразу після розморожування та після однієї години інкубації в термостаті у третій дослідній групі, порівняно з першою та контрольною групами, вони були статистично вірогідними і після трьохгодинного інкубування розмороженої сперми кнурів.

В И С Н О В К И

Додаткова витримка сперми кнурів 10 та 20 секунд у морозильній камері перед її зануренням у рідкий азот позитивно впливає на загальну активність та відносний вміст сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом у дослідних зразках після розмороження сперми кнурів і ця залежність зберігається протягом тригодинного інкубування зразків.

Перспективи подальших досліджень. Розробка покращеного варіанту кріоконсервування сперми кнурів для підвищення виживання сперміїв та їх запліднюючої здатності після розморожування.

EFFECT OF DIFFERENT REGIMES FOR FREEZING ON QUALITY THAWED OF BOAR SEMEN

O. B. Andrushko, S. B. Kornyat, M. M. Sharan

Institute of Animal Biology of NAAS

S U M M A R Y

Investigated survival of sperm and impregnating ability after thawing at different modes of freezing boar semen. The positive effect of short-term exposure of sperm in the freezer before immersion in liquid nitrogen at its freezing that improves the quality of thawed sperm and total sperm activity and survival after thawing.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА КАЧЕСТВО РАЗМОРОЖЕННОЙ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

А. Б. Андрушко, С.Б. Корнят, Н. М. Шаран

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Исследованы выживаемость спермиев и их оплодотворяющую способность после оттаивания при различных режимах замораживания спермы хряков. Установлено положительное влияние кратковременной выдержки спермы в морозильной камере перед погружением в жидкий азот при ее замораживании, что улучшает качество размороженной спермы и общую активность и выживаемость спермиев после деконсервации.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Ескин Г. В.* Теория и практика искусственного осеменения свиней свежевзятой и замороженной спермой / Г. В. Ескин, А. Г. Нарижный, Г. С. Походня // Монография – Белгород: Везелица, 2007. — 253 с.

2. *Наук В. А.* Структура и функции спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук — Кишинев, 1991.—198 с.
3. *Антонюк В. С.* Взаимосвязь физиологических функций и биохимических свойств спермы хряков / В. С. Антонюк // Автореф. дис. д-ра биол. Наук – Харьков, 1984 — С. 49.
4. *Lechniak D.* The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro / D. Lechniak, A. Kedzierski, D. Stanislawski // *Reproduction in Domestic Animal* — 2002. — P. 379–380.
5. *Пушкарь К.* Введение в криобиологию / К. Пушкарь, А. Билоус. — Киев, 1975 — 342 с.
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 / B. M. Ericsson, H. Rodriguez-Martinez // *Reprod. Sci.* — 2000. — 63: P. 205–220.
7. *Бабушкин П.* Оплодотворяющая способность свежего и замороженного эякулята хряков / П. Бабушкин, П. Маерчак // Симпозиум: Криоконсервация семени барана и хряка. — 1984, Варна, София — С. 94–96.
8. *Мельник Ю.Ф.* Інструкція із штучного осіменіння свиней / Відповідальний за випуск Ю. Ф. Мельник. — К.: Аграрна наука, 2003.— 56 с.