

УДК 636.32/38:591.16.612.063

Корбецька О.О., аспірант ©

Інститут біології тварин НААН України, м. Львів

ВПЛИВ ТРИВАЛОСТІ ПРЕІНКУБАЦІЇ СПЕРМИ КНУРІВ ПЕРЕД ЗАМОРОЖУВАННЯМ НА ЇХ МОРФО-БІОХІМІЧНІ ТА КІНЕМАТИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ПІСЛЯ ДЕКОНСЕРВАЦІЇ

У статті наведено результати вивчення впливу часу витримування сперми і типу середовища при 15 °С з 3 до 24 год. Збільшення часу витримки сперми при 15 °С в середовищі "Екосперм" з 3 до 24 год не вплинуло на цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням (80,9 і 83,4 % відповідно) та після деконсервації (43,4 і 42,7 %, відповідно). На відміну, від середовища Екосперм, збільшення часу витримки у середовищі "BTS" з 3 год до 24 год показало достовірно нижчу цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням з 76,4 % до 70,5 %, ніж після розморожування з 41,6 % до 30,3 %. Збільшення часу витримки з 3 до 24 год призвело до зниження ($p < 0,05$) трьох з п'яти параметрів руху після розморожування (VCL, LIN, і BCF). Тип розбавника не чинив вірогідного впливу на інші кінематичні показники.

Ключові слова: сперма, кнур, деконсервація, Екосперм, BTS.

Застосування ЗС у свилярстві оправдує себе в широкому діапазоні, починаючи із генетичних банків, що гарантують отримання потомства від втрачених ссавців у випадках, коли здійснюється вимушений забій тварин, при будь-яких інфекційних спалахах захворювання, або несподіваної загибелі цінних кнурів. У зв'язку з цим, продаж замороженої сперми, замість звичайного продажу живих плідників, забезпечує кращий санітарний захист господарства. Однак, є проблеми, які пов'язані з процедурами кріоконсервації і їх результатами, які лежать в основі обмеженого використання ЗС у кнурів. Спермії, які розбавлені середовищем, порівняно із сперміями після деконсервації, показують нижчу виживаність [1, 2]. Очевидно, що ШО такою спермою спричиняє низький рівень запліднюваності в межах ~ 40-60 %, що є значно нижче, у порівнянні з використанням розбавленої сперми >80 % [3, 5]. Сперма кнура володіє зниженою стійкістю до кріогенної обробки. Це негативно впливає, як на виживання сперміїв після розморожування, так і на їх запліднюючу здатність. При технологічній обробці сперми, розбавленні її синтетичними середовищами, охолодженні та зберіганні в замороженому стані відбуваються значні структурні, фізіологічні і біохімічні зміни, ушкодження сперміїв, що значно знижує їх фертильність.

На основі багатьох досліджень було встановлено [5, 6, 7], що спермії кнура дуже чутливі до холодового шоку. На початку процедури заморожування, перші клітинні ушкодження виникають у результаті швидкого охолодження з

температури сперми при еякуляції до температури нижче 15 °С. В результаті чого втрачається життєздатність значної кількості спермій, особливо коли охолодження продовжується до 1-2 °С, виникають морфологічні зміни. Коли розбавлену сперму, витримувати при температурі вище 15 °С кілька год, спермії набувають стійкості до холодового шоку. Швидке охолодження з 35 °С до 15 °С свіжорозбавленої сперми призводить до значних втрат рухливості тоді як, при охолодженні великих об'ємів (100 мл) стійкість спермій до охолодження зростає повільно. Преінкубація протягом щонайменше 24 год перед зниженням температури нижче 15 °С підвищує стійкість спермій до холодового шоку, що заслуговує уваги у повсякденній роботі [6, 7].

Зміни в сперміях, які підвищують стійкість до холодового шоку до сих пір до кінця не з'ясовані. Як було показано холодовий шок може бути пов'язаний з ліпідним складом бішару плазматичних мембран, а саме текучість плазматичних мембран. При зниженні температури обмеження латерального руху фосфоліпідів мембран можуть призвести до переходу з рідини до гелевої фази. В результаті того, що різні мембранні ліпіди мають різну температуру переходу може виникати розділення фаз з одночасною незворотною кластеризацією протеїнів мембран. Ці автори [8, 10], стверджували, що відповідь певних клітинних мембран на вплив низьких температур тісно пов'язані з мембранним складом цих клітин.

При вивченні можливості транспортування сперми кнурів на великі відстані в лабораторію, щоб провести її заморожування дуже важливим є те, що в процесі тривалого транспортування якість сперми може знижуватись і бути не придатною для заморожування. Як правило, сперма кнура заморожується через 3 год після її взяття [9, 11]. При дослідженні більш тривалого часу витримування після взяття (24 год) та температури її витримування повинні бути враховані ключові параметри якості сперми, що найбільше корелюють з фактичною запліднюючою здатністю сперми, а саме: загальна рухливість, кінематичні показники (характеристика швидкості і траєкторії руху), цілісність плазматичних мембран та акросом спермій.

Враховуючи вищесказане, дослідження були скеровані на вивчення впливу тривалішого витримування (24 год) сперми кнура перед заморожуванням в середовищах «Екосперм» та «BTS» на якість сперми після деконсервації.

Матеріал і методи. У дослідах використовували сперму шістьох клінічно-здорових статевозрілих кнурів віком 2-5 р., живою масою 200 – 340 кг, порід – велика біла (2), п'єтрен (1), ландрас (2), гемпшир (1), що утримувались в ТзОВ НВЦ “Зіхидплемресурси” на сухому збалансованому раціоні. Для досліджень використовували тільки 1-шу та 2-гу фракції еякуляту.

Сперма була розділена на 4 частини; 2 частини були розбавлені в середовищі «BTS», інші дві частини були розбавлені в середовищі «Екосперм». Розбавлена сперма була повільно охолоджена до 15 °С протягом 3 год і утримувалась додаткових 21 год для симуляції тривалого транспортування. Плазма сперми і середовище були відділені шляхом центрифугування.

Рухливість, цілісність плазматичних мембран та акросом визначались одразу перед заморожуванням і через 30 хв після розморожування.

Визначення рухливості, активності та кінематичних показників якості спермійв кнуря проводився на системі Sperm Vision (Minitube, Німеччина). За допомогою даної системи проводили автоматичне визначення рухливості спермійв, об'єктивну і оптимальну за часом можливість визначення якості сперми. Дослідження рухливості деконсервованих спермійв проводили під мікроскопом Olympus (Японія), методом позитивного фазового контрасту, при збільшенні $\times 200$. П'ять полів зору були вибрані на поверхні камери, і вираховували середній результат. Швидкість камери налаштовувалась на 20 кадрів в секунду. Об'єкти, розміщені в камері, розпізнавались, як спермії за розмірами і яскравістю.

Ступінь ушкодження акросомальних мембран спермійв вимірювали за зростанням активності маркерного ферменту акрозина в середовищі при зростанні кількості ушкоджених спермійв. Метод визначення акрозину базується на його взаємодії з БАЕЕ (N α -бензоїл-L-аргінін етиловий ефір). Вимірювання проводили фотометричним методом, фіксуючи зростання екстинції N α -бензоїл-L-аргінину на спектрофотометрі СФ 26 (Ломо, СРСР) при довжині хвилі 259 нм за одну хвилину ($\Delta A_{259\text{nm}}/\text{хв}$) проти холостої проби (замість зразка додавали 100 мкл Тріс буферу).

Цілісність плазматичних мембран спермійв визначали за зростанням активності маркерного фермента лактатдегідрогенази (ЛДГ) в середовищі. Активність ЛДГ в плазмі/середовищі визначали кінетичним методом за допомогою набору Liquick Cor-LDH® (PZ Cormay S.A., Польща). Метод базується на зміні коефіцієнта поглинання при довжині хвилі 340 нм, прямо пропорційній активності лактатдегідрогенази у середовищі.

Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-26 (Ломо, СРСР) з термостатуванням кювет (37 °С), які з кварцового скла і з оптичним шляхом 10 мм та комп'ютерною системою «СФ-Комплект» (Акроміон, Україна). Зміну оптичної густини фіксували протягом трьох хвилин.

Збереженість акросом (ЗА %) та цілісність плазматичних мембран (ЦПМ) вираховували за формулою:

$$\text{ЗА\%, ЦПМ \%} = 100 * (\text{max} - \text{sample}) / \text{max}$$

де:

max – активність акрозину або ЛДГ в середовищі при примусовому ушкодженні акросом і цілісність плазматичних мембран в суспензії свіжоотриманих спермійв з концентрацією 100×10^6 спермійв/мл за допомогою Triton X-100, вважалось що ушкодилось 100 % акросом;

sample – активність акрозину або ЛДГ в дослідному зразку.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм Statistica 8 (StatSoft, США).

Результати дослідження. Вплив кріоконсервації, часу витримки сперми при 15 °С перед концентруванням і типу середовища на рухливість, цілісність плазматичних мембран та акросом спермій показані у (табл.1). Процес кріоконсервації вірогідно вплинув на ці показники, а саме цілісність плазматичних мембран знизилась ($p<0,05$) з 78 % до 39 % після розморожування. Тип середовища і час витримання сперми при 15 °С були єдині фактори, які суттєво вплинули на цілісність плазматичних мембран. Збільшення часу витримки при 15 °С в середовищі Екосперм з 3 до 24 год не вплинуло ні на цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням (80,9 і 83,4 % відповідно), ні на цілісність плазматичних мембран після розморожування (43,4 і 42,7 %, відповідно).

Таблиця 1

Вплив часу витримки при 15 °С, типу середовища на цілісність плазматичних мембран і акросом та рухливість спермій ($n=6$, $M\pm m$)

Технологічний етап	Час витримки при 15 °С, год	Тип середовища	Цілісність плазматичних мембран, %	Цілісність акросом, %	Рухливість, %
Перед заморожуванням	3	Екосперм	81,6±4,1	76,2±3,8	67,1±3,4
	24		82,3±4,3	75,8±3,9	56,3±3,6
	3	BTS	78,5±3,9	75,8±4,5	66,7±4,1
	24		70,5±3,5	72,2±5,2	58,9±3,2
Після розморожування	3	Екосперм	43,4±2,2	43,2±2,6	25,8±1,7
	24		42,7±2,3	44,8±2,5	25,9±3,2
	3	BTS	41,6±2,1	37,9±2,1	29,2±1,7
	24		30,3±1,6	39,7±2,6	26,0±1,8

На відміну від середовища Екосперм, збільшення часу витримки у середовищі BTS з 3 год до 24 год було отримано достовірно нижчу цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням з 76,4 % до 75,8 %, ніж після розморожування з 41,6 % до 29,2 %. Тільки заморожування зразків ($p<0,05$) мала достовірний вплив на зниження цілісності акросом ($p<0,05$) з 80,5 % перед заморожуванням до 41,4 % після розморожування. Також кріоконсервація чинила значний вплив на рухливість спермій ($p<0,05$), і знизилось з 62 % перед заморожуванням до 27 % після розморожування.

Таблиця 2

Вплив часу витримки при 15 °С, типу середовища на параметри руху спермійв (n=6, M±m)

Технологічний етап	Час витримки при 15 °С (год)	Тип середовища	VCL	VSL	LIN	BCF	ALH
Перед заморожуванням	3	Екосперм	106,9±14,2	23,2±3,1	19,7±3,2	12,3±0,6	6,7±0,5
	24		96,0±9,8	16,8±6,2	15,3±5,7	9,0±0,7	6,4±0,9
	3	BTS	106,1±16,1	25,7±3,5	21,6±5,3	13,0±0,9	6,3±1,1
	24		95,2±12,4	20,0±4,6	18,7±3,1	10,1±1,2	5,7±0,6
Після розморожування	3	Екосперм	74,3±9,8	11,0±3,7	12,1±2,8	5,6±0,1	4,4±0,9
	24		68,4±6,8	6,9±4,8	9,0±2,1	3,5±0,7	3,9±0,8
	3	BTS	77,2±9,1	10,2±6,4	11,3±1,9	5,2±1,8	4,3±1,3
	24		57,3±5,1	13,0±5,3	8,9±2,6	3,2±1,9	5,5±1,4

Вплив кріоконсервації, розбавників та часу витримки перед заморожуванням, кінематичні показники спермійв показані у (табл. 2). Замороження чинило основний вплив на всі параметри руху, спричиняючи зниження цих показників після розморожування у порівнянні до параметрів руху перед заморожуванням на 28-60 %, ($p < 0,05$). Збільшення часу витримки з 3 до 24 год призвело до зниження ($p < 0,05$) трьох з п'яти параметрів руху після розморожування (VCL, LIN, і BCF). Тип розбавника не чинив достовірного впливу на інші кінематичні показники.

Цілісність плазматичних мембран і цілісність акросом перед заморожуванням і після деконсервації не корелювали ($p < 0,05$) між собою, з рухливістю спермійв, ні з параметрами руху в групах до заморожування і після деконсервації. Але рухливість перед заморожуванням мала позитивну кореляцію ($p < 0,05$) з VCL, VSL, LIN, і BCF ($r = 0,84, 0,68, 0,53$ і $0,78$, відповідно). Однак, рухливість після розморожування не корелювала ($p > 0,05$) з кінематичними показниками.

Відсутність вірогідного впливу часу витримки на цілісність плазматичних мембран і цілісність акросом в спермі перед заморожуванням не узгоджується з попередніми дослідженнями по вивченню часу витримки у середовищі BTS 3, 10, і 20 год [7, 8]. У нашому досліді, збільшення часу витримки суттєво знизило 3 з 5 кінематичних показників спермійв. Зниження інтенсивності чи швидкості руху спермійв в результаті 24 год витримки може вказувати про зниження рухливості в яйцепроводах і є важливим для спермійв здійснювати успішне запліднення яйцеклітини [9,11].

Висновки.

Тип середовища і час витримання сперми при 15 °С були єдині фактори, які суттєво вплинули на цілісність плазматичних мембран. Збільшення часу витримки при 15 °С в середовищі Екосперм з 3 до 24 год не вплинуло ні на

цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням (80,9 і 83,4 % відповідно), ні на цілісність плазматичних мембран після розморожування (43,4 і 42,7 %, відповідно). На відміну від середовища Екосперм, збільшення часу витримки у середовищі BTS з 3 год до 24 год було отримано вірогідно нижчу цілісність плазматичних мембран перед заморожуванням з 76,4 % до 70,5 %, після розморожування з 41,6 % до 30,3 %. Збільшення часу витримки з 3 до 24 год призвело до зниження ($P < 0,05$) трьох з п'яти параметрів руху після розморожування (VCL, LIN, і VCF). Тип розбавника не чинив вірогідного впливу на інші кінематичні показники. Отже, розбавлення свіжоотриманої сперми в середовищі Екосперм та зберігання чи транспортування при 15 °C протягом 24 год, вірогідно не вплинуло на результативність технології кріоконсервації, і може бути запропоновано господарствам, які знаходяться на великій відстані від лабораторії, де заморожується сперма кнурів.

Література

1. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук. — Кишинев, 1991. — 198 с.
2. Hernandez M, Roca J, Gil MA, Vazquez JM, Martinez EA. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 2007;67:1436–45.
3. Medrano A. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. Ph.D. Thesis, University of London, London, UK; 1998.
4. Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM, Martinez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 2006;84:2692–9.
5. He L, Bailey JL, Buhr MM. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod* 2001;64:69–79.
6. Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Jahannisson A, Rodriguez- Martínez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra- uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* 2005;63:1320–33.
7. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005;63: 411–21.
8. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3–22.
9. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000;60:481–92.
10. He L, Bailey JL, Buhr MM. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod* 2001;64:69–79.
11. Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Matas C, Blanco O. The fertilizing ability assessment of fresh and stored boar semen. *Reprod Dom Anim* 1998;33:267–70.

Summary**Korbetska O.O.****EFFECT OF DURATION OF EXPOSURE TO THE FREEZING OF BOAR SEMEN IN THEIR MORPHO-BIOCHEMICAL AND KINEMATIC PARAMETERS OF SPERM QUALITY AFTER THAWING**

In this article are given the study results of the effect of sperm preincubation time and the type of environment at 15 °C from 3 to 24 h. Increasing the preincubation time of semen at 15 ° C in a medium "Ekosperm" from 3 to 24 h did not affect the integrity of the plasma membrane before freezing (80,9 and 83,4 %, respectively), and after thawing (43,4 and 42,7 %, respectively). In contrast, the medium "Ekosperm", increasing the exposure time among the VTS from 3 h to 24 h showed significantly lower plasma membrane integrity before freezing from 76,4 % to 70,5 %, than after thawing from 41,6 % to 30,3 %. Increasing the exposure time from 3 to 24 h resulted in a decrease ($p < 0,05$), three of the five motion parameters after thawing (VCL, LIN, and BCF). Type diluent did not likely impact on other kinematic indicators.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Федорович Є.І.