



УДК 57.082.1::591.463.1

Нові підходи щодо оцінки якості генетичного матеріалу бугаїв-плідників

М.С. Савельєва, О.Б. Сушко
savelieva_marina@inbox.ru

*Інститут тваринництва НААН,
вул. 7-ої Гвардійської Армії, 3, смт Кулиничі, Харківський р-н, Харківська обл., 62404, Україна*

Запропоновано модернізований метод оцінки якості сперми бугаїв. Встановлено, що обробка сперми з використанням градієнтів щільності сприяє підвищенню показників рухливості, виживаності та абсолютної виживаності як у свіжих зразках, так і в заморожено-відталій спермі, що дає можливість більш об'єктивно охарактеризувати якість біоматеріалу. Запропоновані нові характеристики спермограм бугаїв: «виживаність потенційно-фертильної фракції сперми», «показник абсолютної виживаності потенційно-фертильної фракції сперми» можуть стати важливими критеріями оцінки еякулятів бугаїв. Наведено результати досліджень показників біологічної якості сперми бугаїв симентальської Української чорно-рябої молочної та червоно-рябої голштинської породи залежно від методу обробки проб.

Потенційно-фертильна фракція як свіжоотриманої, так і заморожено-відталої сперми, суттєво відрізняється за рядом біологічних від середніх показників сперми, що робить необхідним введення в показники спермограми додаткових характеристик. Показник виживаності потенційно-фертильної фракції заморожено-відталої сперми підвищився майже на 3 год, або на 32,8 %. Показник абсолютної виживаності потенційно-фертильної фракції підвищився на 8,19 умов.одн.

Ключові слова: бугаї, глибокозаморожена сперма, деконсервація, рухливість, виживаність, потенційно-фертильна фракція.

Новые подходы к оценке качества генетического материала быков-производителей

М.С. Савельєва, А.Б. Сушко
savelieva_marina@inbox.ru

*Інститут животноводства НААН,
ул. 7-й Гвардейской Армии, 3, пгт Кулинич, Харьковский р-н, Харьковская обл., 62404, Украина*

Предложено модернизированный метод оценки качества спермы быков. Установлено, что обработка спермы с использованием градиентов плотности превышает показатели активности, выживаемости и абсолютной выживаемости как у свежеполученных образцах, так и в заморожено-оттаянной спермы, что дает возможность более объективно охарактеризовать качество биоматериала. Приведены результаты исследований биологического качества спермы быков симментальской черно-пестрой и красно-пестрой голштинской породы в зависимости от метода обработки проб.

Потенциально фертильная фракция как свежеполученной так и заморожено-оттаявшей спермы, существенно отличается по ряду биологических средних показателей спермы, что делает необходимым введение в показатели спермограммы дополнительных характеристик. Показатель выживаемости потенциально фертильной фракции заморожено-оттаявшей спермы повысился почти на 3 часа, или на 32,8%. Показатель абсолютной выживаемости потенциально фертильной фракции повысился на 8,19 усл. ед.

Ключевые слова: быки, свежеполученная сперма, глибокозамороженная сперма, деконсервація, активність, виживаемість, потенціально-фертильна фракція.

Citation:

Savelieva, M., Suchko, A. (2017). New approaches to the assessment of the quality of genetic material bulls. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(74), 99–102.

New approaches to the assessment of the quality of genetic material bulls

M. Savelieva, A. Suchko
savelieva_marina@inbox.ru

*Institute of animal science NAAS,
7th Guards Army Str., 3, village Kulinich, Kharkov district, Kharkov region, 362404, Ukraine*

On the first stage experiments are conducted by the aim of establishment on how many higher the real indexes of fresh sperm and dilute protective environments after moving away of cellular debris, extraneous cages and dead cages. On the second stage, comparison of basic physiological indexes of the fertilization faction got from deconservation sperm and compared to the corresponding indexes of z sperm was conducted, that was not subject to the special cleansing procedure. Difference between research and control groups, in relation to survivability of sperm and index of absolute survivability of sperm was statistically reliable ($P < 0,001$), as for fresh sperm so for sperm, that carried freezing and thawing in liquid nitrogen. Faction of sperm, that has impregnating ability potentially, as fresh sperm so that was subject to freezing and thawing substantially differ in the row of biological indexes of sperm, that creates the necessity of introduction of new additional descriptions for the analysis of sperm. Index of survivability of sperm, that potentially has impregnating ability at deconservation sperm rose on three hours or on a 32,8 percents. Index of absolute survivability of sperm, that potentially has impregnating ability rose on 8,19 conditional units.

The modernized method of estimation of quality of sperm of bulls is offered. It is set that treatment of sperm with the use of gradients of closeness exceeds the indexes of activity, to survivability and absolute survivability as at fresh standards of sperm so at deconservation standards of sperm, that gives an opportunity more objectively to describe quality of sperm. Results over of researches of biological quality of sperm of bulls of meat blackly-pied and red-pied suckling breed are brought depending on the method of treatment of tests. Additional descriptions of analysis sperm are entered, they can become the major criteria of estimation of full value and impregnating ability.

Key words: bulls, freshly prepared sperm, sperm Deep, Depreserve, activity, survival.

Вступ

Ефективне використання плідників визначається числом одержаного від них приплоду. Однак оцінка відтворювальної здатності бугаїв дуже складна і не завжди достатньо об'єктивна, оскільки на заплідненість маток можуть впливати, окрім якості сперми, безліч інших чинників, не пов'язаних із самим плідником. Оцінка бугаїв за якістю їхньої сперми достатньо швидка. Загальновідомі методи досліджень ґрунтуються на визначенні числа спермій в еякуляті (Sherhyn, 1967; Mursalov, 1999), їх виживаності (GOST 26030-83, 1984; DSTU 3535-97, 1998), активності окремих ферментів (Plohinskiy, 1970; Ostashko, 1990) тощо.

Актуальність теми: на сьогодні основним методом оцінки біологічної якості сперми бугаїв є створення спермограм, що будуються на визначенні головних фізіологічних показників, таких як рухливість, виживаність, абсолютний показник виживаності, концентрація спермій. Причому це стосується як свіжорозбавленої, так і деконсервованої сперми плідників. Водночас варто відмітити, що на ці показники (крім концентрації) можуть суттєво впливати ряді сторонні фактори. Зокрема виживаність живих спермій еякуляту може значною мірою залежати від наявності й кількості в середовищі мертвих спермій та інших сторонніх включень.

Вивчення питання обробки сперми великої рогатої худоби перед її технологічною заготівлею та після деконсервації є актуальним завданням.

Мета і завдання дослідження. В зв'язку з цим нами розроблявся метод оцінки біологічної якості сперми, що передбачає поряд із традиційними показниками – визначити виживаність та інші біологічні показники для її активної частини. Тобто тієї функціональної частки, яка в подальшому і є вирішальною,

щодо процесу запліднення, або, інакше кажучи, є потенційно-фертильною фракцією.

Матеріал і методи досліджень

Роботи проводились на базі племінного підприємства в Інституті тваринництва НААН за використання бугаїв-плідників симентальської, Української чорно-рябої молочної та червоно-рябої голштинської породи. Сперму отримували 1–2 рази на тиждень, по 2 еякуляти з інтервалом між садками 10–15 хвилин. Отриманий еякулят оцінювали органолептично (візуально) на наявність у спермі крові, сечі, гною, що є критерієм вибраковування еякуляту. Для визначення рухливості сперми відбирали зразок та визначали під мікроскопом при збільшенні в 120–180 раз. Визначення показника концентрації сперми проводили за допомогою приладу КФК-2. Сперму відбирали з концентрацію не менше ніж 0,7 млрд/мл.

Існує кілька методик виділення активної фракції сперми, серед яких нами обрано метод центрифугування біоматеріалу у двошаровому градієнті як технологічний сучасний метод (Sherhyn, 1967; Mursalov, 1999).

На першому етапі проведено експерименти з метою встановлення – наскільки вищі реальні показники свіжої і розбавленої захисним середовищем сперми після видалення так званого дебриса (cellular debris) сторонніх і мертвих клітин.

На другому етапі було здійснено порівняльне визначення основних фізіологічних показників потенційно-фертильної фракції, отриманої з деконсервованої сперми та порівняно з відповідними показниками біоматеріалу, що не піддавався спеціальній очищувальній процедурі.

Окрім того, наявність бактерій в еякуляті може впливати на запліднювальну здатність та призводити

до зниження рухливості та передчасної акросомної реакції. Важливо використовувати таку технологічну обробку сперми, яка б дозволяла відбирати нормальні, активні спермії з загальної маси в еякуляті.

У досліджах було використано градієнти щільності SpermGradient (COOK Medical Ukrainian Representative), що являють собою ізотонічний збалансований фізіологічний соляний буферний розчин, який має у своєму складі покриті сіланом колоїдні частки кремнію. При проведенні експериментів застосовували метод «розділених еякулятів».

Розділення сперми на фракції засновано на тому, що зрілі спермії мають більшу щільність ДНК, ніж 80% розчин градієнту, тому, проходячи скрізь нього, осідають на дні пробірки. Для отримання потенційно-фертильної фракції свіжорозбавлену або деконсервовану сперму піддавали центрифугації при 800 g у двошаровому градієнті щільності протягом 10 хвилин (дослідна група). Після цього видаляли надосадову рідину та додавали середовище для розрідження і кріоконсервування сперми бугаїв. Вдруге проводили центрифугування сперми протягом 10 хв і знову видаляли надосадову рідину. Визначали рухливість та концентрацію сперми під мікроскопом згідно з ДСТУ 3535-97 «Сперма бугаїв нативна» (Ostashko, 1990).

Після другого центрифугування сперму розріджували середовищем для заморожування за регламентом Харківської технології асептичного отримання сперми бугаїв-плідників (Plohinskij, 1970). Після заморожування та кріозберігання сперми проводили її деконсервацію за температури 38 °C та центрифугували один раз у градієнті щільності для видалення некріо-

резистентних статевих клітин. Таким чином після розморожування отримували найбільш активні – придатні до запліднення спермії.

Перевірку деконсервованих зразків сперми, яка попередньо зберігалась у зрідженому азоті, проводили з використанням візуального методу та ГОСТ 26030-83. «Сперма быков замороженная».

Результати досліджень опрацьовували методом варіаційної статистики на основі розрахунку середньої арифметичної (M), відхилення показників середньої арифметичної, похибки (m). Для визначення рівня достовірності (P) використано значення критерію вірогідності за Стьюдентом при трьох рівнях: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001, які мають величину середньої арифметичної похибки, що досліджуються при малій та великій кількості об'єктів.

В процесі експериментів було задіяно 27 еякулятів від бугаїв-плідників.

Результати та їх обговорення

Порівняно з традиційним методом обробки сперми було зафіксовано відсутність епітеліальних клітини, суттєве зменшення неактивних та пошкоджених сперміїв, які можуть негативно впливати на якісні показники сперми, знижуючи точність оцінки. Метод показав, що при центрифугуванні різні клітини займають відповідне положення, в якому їх плавуча щільність відповідає щільності градієнту. Результати порівняльної оцінки фізіологічних показників потенційно-фертильної фракції свіжорозбавленої сперми бугаїв наведено у таблиці 1.

Таблиця.1

Порівняльні фізіологічні показники потенційно-фертильної фракції свіжоотриманої сперми (n = 18)

Показники біологічної якості сперми	Потенційно-фертильна фракція свіжорозбавленої сперми (дослід)	Свіжорозбавлена сперма (контроль)
Рухливість, бали (%)	9,02 ± 0,06 (90,2% ± 0,6%)	7,52 ± 0,04 (75,2% ± 0,4%)
Вживаність (годин)	21,62 ± 2,80*	12,0 ± 1,50
Показник абсолютної вживаності (Sa, умовн. одн.)	123,2 ± 4,70*	81,53 ± 4,87

Із наведених даних бачимо, що вживаність сперми при її інкубуванні за температури 38 °C після видалення дербісу складала 21,62 год, тобто була на 9,62 год більшою.

Термін вживаності отриманої потенційно-фертильної фракції був у 1,75 раза більшим, ніж у необробленої сперми. Це позначилося і на показнику абсолютної вживаності, що характеризує динаміку зниження рухливості сперми. Так, у отриманої очищеної активної частини сперми показник вживаності склав 123,2 умов. од. перевершуючи контрольний показник на 41,7 умов. од. (P < 0,001). Треба також відмітити і більш високий показник стартової рухливості в дослідній групі, яка складала 9,02 бала, тобто більше ніж 90% сперміїв проявляли прямолінійно-поступовий рух. У відносному вимірюванні це вище за контроль на 16,6%.

В другому експерименті досліджено зразки заморожено-відталогої сперми, отримані з 9 серій (серія –

партія спермодоз, вироблених із одного еякуляту). Результати оцінки потенційно-фертильної фракції порівняно з показниками деконсервованої сперми наведено у таблиці 2.

З наведених в таблиці даних видно, що отримана потенційно-фертильна фракція заморожено-відталогої сперми, як і в першому досліді, значно перевершувала контрольні зразки. Так, вживаність її в середньому складала 8,75 год, що довше майже на 3,00 год. У відносному вимірюванні потенційно-фертильна фракція сперми перевершує контрольні зразки за вживаністю на 32,80%. Динаміка зниження рухливості у потенційно-фертильної фракції також суттєво відрізнялось від необробленої деконсервованої сперми, що характеризується показником абсолютної вживаності, який був на 8,19 умовн. од. більшим на користь контролю.

Фізіологічні показники отриманої потенційно-фертильної фракції порівняно з показниками деконсервованої сперми, що не була спеціально оброблена (n = 9).

Показники біологічної якості сперми	Потенційно-фертильна фракція деконсервованої сперми (дослід)	Деконсервована сперма (контроль)
Рухливість, бали (%)	6,50 ± 0,16 (65,0% ± 1,6%)	4,38 ± 0,13 (43,8% ± 1,3%)
Виживаність (годин)	8,75 ± 0,16*	5,88 ± 0,23
Показник абсолютної виживаності (Sa, умовн. одн.)	24,00 ± 0,50*	15,81 ± 0,42

Отримана різниця між дослідною та контрольною групами щодо виживаності та показника абсолютної виживаності була статистично достовірною ($P < 0,001$) як для свіжоотриманої, так і для деконсервованої сперми.

Таким чином, проведеними дослідженнями створено базу для подальшого розвитку методів оцінки біологічної якості сперми бугаїв, спрямованих на прогнозування її фертильності. На нашу думку, запропоновані додаткові характеристики спермограм бугаїв, а саме: «виживаність потенційно-фертильної фракції сперми», «показник абсолютної виживаності потенційно-фертильної фракції сперми» можуть стати важливими критеріями оцінки якості сперми свіжоотриманих еякулятів бугаїв.

Висновки

Потенційно-фертильна фракція як свіжоотриманої, так і деконсервованої сперми, суттєво відрізняється від біологічних показників сперми, що робить необхідним введення в показники спермограми додаткових характеристик. Показник виживаності потенційно-фертильної фракції деконсервованої сперми підвищився майже на 3 год, або на 32,8%. Показник абсолютної виживаності потенційно-фертильної фракції підвищився на 8,19 умов.одн.

Перспективи подальших досліджень. Запропонована система оцінки сперми буде сприяти підвищенню ефективності використання заморожено-відталого біоматеріалу. Введені додаткові характеристики спермограм – «виживаність потенційно-фертильної фракції

сперми», та «показник абсолютної виживаності потенційно-фертильної фракції сперми», можуть стати важливими критеріями оцінки. Безумовно, що проведена робота є першим кроком і отримані характеристики потребують обґрунтування через визначення корелятивного зв'язку з запліднюючою здатністю сперми.

Бібліографічні посилання

- Mursalov, B. Je. (1999). Sposob poluchenija kletocnyh frakcij dlja iskusstvennogo razmnozhenija zhivotnyh. № 2142226 (in Russian).
- Sherhyn, N. P. (1967). Vyokhymyya spermu Selskokhozyaystvennykh zhyvotnykh [Biochemistry Of domestic animal spermatozoa] (in Russian).
- Ofitsiyniy sait kompanii COOK Medical Ukrainian Representative [Elektronnyi resurs]. – Rezhym dostupu: http://stoik.com.ua/work_with_culture/30-rabota-s-gametami.html (in Ukrainian).
- DSTU 3535-97 (1998). Sperma buhain natyvna. Tekhnichni umovy. K.: Derzhspozhyvstandart Ukrainy, 24 (in Ukrainian).
- GOST 26030-83 (1984). Sperma bykov zamorozhennaja. Tehnicheskie uslovija. M., 6 (in Russian).
- Ostashko, F. I. (1990). Har'kovskaja tehnologija asepticheskogo vzjatija i kriokonservacii spermy bykov proizvoditelej: Metodicheskie rekomendacii (in Russian).
- Plohinskij, N. A. (1970). Biometrija. M.: Izdat Mosk. Univer (in Russian).

Стаття надійшла до редакції 20.02.2017