УДК: 636.4:612.616:591.133.2

ВПЛИВ ДІАМЕТРА СОЛОМИНОК ТА РЕЖИМУ ЇХ ДЕКОНСЕРВАЦІЇ НА АКТИВНІСТЬ ДИФУНДОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ У ПРОЦЕСІ КРІОКОНЦЕРВАЦІЇ СПЕРМИ КНУРІВ

О. О. Корбецька
korbetska.olya@inenbiol.com.ua

Інститут біології тварин НААН, Львів, 79034, вул. В. Стуса, 38, Україна

У статті наведено результати вивчення впливу різних діаметрів соломинок (2, 2,8, 5 і 7 мм) для кріоконсервації сперми кнурів на ступінь ушкодження плазматичних мембран і акросом та переживаність сперміїв після деконсервації. Вивчено рівень ушкодження сперміїв за активністю ферментів: аспартатамінотрансферази (АсАТ) та кислої фосфатази (КФ), дифундованих при ушкодженнях клітин у середовище, а також виживання сперміїв протягом часу. Використовували еякуляти від чотирьох кнурів породи ландрас. Після оцінки еякулятів (об'єм, активність, концентрація) проводили еквілібрацію при 5 ºС впродовж 120 хв. Заморожування сперми здійснювали в соломинках об'ємом 0,25, 0,5, 2 і 4 мл діаметром 2, 2,8 , 5 і 7 мм відповідно, на програмному заморожувачі Planer R204, після чого соломинки переносили у рідкий азот. Розморожування сперми проводили при 37 ºС впродовж 30 с, 50 ºС — 12 с і 70 ºС — 8 с. У плазмі (середовищі) визначали активність АсАТ та КФ. Крім того, досліджували виживання сперміїв. Найнижчою активність АсАТ і КФ після деконсервації сперми кнурів у середовищі була при застосуванні соломинок з діаметром 2 і 2,8 мм та температури розморожування 50 ºС протягом 12 с, що свідчить про краще збереження цілісності плазматичних мембран сперміїв при застосуванні цього поєднання діаметра соломинки і температури розморожування у порівнянні з іншими дослідними зразками. Спермії, заморожені у соломинках діаметром 2,8 мм, показали найвищі результати виживання при температурі розморожування 50 ºС і становили 7,6 год.

Ключові слова: КНУР, СПЕРМА, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ, ДЕКОНСЕРВАЦІЯ, УПАКОВКА, ВИЖИВАНННЯ, АсАТ, КФ

INFLUENCE DIAMETR STRAW AND REGIME OF THEIR THAWING ON ACTIVITY ENZYME IN PROCESS CRYOPRESERVATION BOAR SPERM

O. O. Korbetska
korbetska.olya@inenbiol.com.ua

Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, 79034, st. V. Stus 38, Ukraine

In this article are given the study results of the impact of various straw diameters (2, 2.8, 5 and 7 mm) on boar spermatozoa longevity, plasma membrane and acrosome intactness after thawing. The level of spermatozoa structures damage by biochemical enzyme markers such as aspartateaminotransferase (AST) and acid phosphatase (AP) that leak out of the cells to the surrounded media during freezing thawing process was studied. Were used ejaculates of four Landrace boars. After ejaculate evaluation (volume, activity, concentration) semen equilibration at 5 ºC for 120 min was performed. Freezing semen in straws was performed in a volume of 0.25, 0.5, 2 and 4 ml and diameters of 2, 2.8, 5 and 7 mm, respectively, at the program cell freezer Planer R204, after which the straws were transferred to liquid nitrogen. Thawing semen was held at 37 ºC for 30 s, 50 ºC — 12 s and 70 ºC — 8 s. In plasma (medium) were measured the activity of AST and AP, also was examined longevity of spermatozoa. The lowest activity of AST and AP after thawing of porcine semen among the tested straw diameters was with the smallest diameter (2 and 2.8 mm) at thawing temperature 50 ºC for 12 s, indicating better preservation of plasma membrane integrity of spermatozoa using the combination of these straw diameters and thawing temperatures compared with other samples.

Keywords: BOAR, SPERM, CRYOPRESERVATION, STRAWS, THAWING, SURVIVAL, ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (AST), ACID PHOSPHATASE (AP)

ВЛИЯНИЕ ДИАМЕТРОВ СОЛОМИНОК И РЕЖИМА ИХ РАЗМОРАЖИВАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ДИФУНДОВАНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

О. О. Корбецька
korbetska.olya@inenbiol.com.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; г. Львов, 79034, Украина

В статье приведены результаты изучения влияния различных диаметров соломинок (2, 2,8, 5 и 7 мм) для криоконсервации спермы хряков на качество ёё после деконсервации. Изучено уровень повреждения спермиев с помощью определения активности фермента аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и кислой фосфатазы (КФ,) дифундованих при повреждениях клеток в среду, а также переживаемость спермиев в течение часу. Использовали эякуляты от четырех хряков породы ландрас. После оценки эякулятов (объем, активность, концентрация) проводили еквилибрацию при 5 ºС в течение 120 мин. Замораживание спермы осуществляли в соломинках объемом 0,25, 0,5, 2 и 4 мл диаметром 2, 2,8, 5 и 7 мм соответственно, на программном замораживатели Planer R204, после чего соломинки переносили в жидкий азот. Размораживание спермы проводили при 37 ºС в течение 30 с, 50 ºС — 12 с и 70 ºС — 8 с. В плазме (среде) определяли активность АсАТ и КФ. Кроме того, исследовали выживания спермиев. Самой низкой активность АсАТ и КФ после деконсервации спермы хряков была в среде при применении соломинок с наименьшим диаметром (2 и 2,8 мм) и температуры размораживания 50 ºС в течение 12 с, что свидетельствует о лучшем сохранения целостности плазматических мембран спермиев при применении данного сочетания диаметра соломинки и температуры размораживания по сравнению с другими опытными образцами.

Ключевые слова: ХРЯК, СПЕРМА, КРИОКОНСЕРВАЦИЯ, ДЕКОНСЕРВАЦИЯ, УПАКОВКА, ВЫЖИВАЕМОСТЬ, АсАТ, КФ

Застосування штучного осіменіння у свинарстві має високий генетичний та економічний потенціал — зберігання сперми при наднизьких температурах (–196 ºС) та транспортування її на великі відстані дозволяє ефективніше використовувати сперму цінних кнурів [1–3].

Тому в світі інтенсивно проводяться дослідження з удосконалення технологій кріоконсервування сперми кнурів з наступним її використанням для штучного осіменіння свиней, яка б забезпечувала задовільні для виробництва показники заплідненості. Дослідження в цьому напрямку поділені на наступні етапи: відпрацювання кращого способу підготовки сперми до кріоконсервації, процедури заморожування (режим і склад середовища), розморожування сперми кнурів, підготовка її до осіменіння та сама техніка осіменіння. При підготовці сперми кнурів до заморожування важливе місце займає час її витримки при кімнатній температурі після отримання перед подальшими маніпуляціями з метою підвищення її стійкості до шкідливого впливу етапів технології в цілому та охолодження і заморожування зокрема.

Фасування сперми займає ключове значення в технології кріоконсервації сперми, особливо у кнурів, так як форма, діаметр і об'єм її впливають на якість деконсервованої сперми. Крім того, від фасування сперми 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 удосконалення 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 аспартатамінотрансферази (АсАТ) і кислої фосфатази (КФ) із сперміїв у плазму [4–6]. Окремі моменти технологічної обробки сперми (розбавлення із середовищем) викликають втрату АсАТ [6, 8]. Спостерігається висока кореляція вмісту АсАТ у свіжоодержаній і розмороженій спермі із заплідненістю свиноматок. Це послужило основою використання ступеня витоку ферментів із сперміїв як тесту пошкодження мембран при технологічних маніпуляціях [7, 8].

Мета досліджень — вивчити вплив діаметра соломинок для фасування сперми кнурів, температури її деконсервації на біохімічні та фізіологічні показники сперміїв після розморожування.

Матеріали і методи

Дослідження проводили в лабораторії фізіології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. Сперму для досліджень відбирали мануальним методом від чотирьох кнурів породи ландрас віком від двох до чотирьох років у ЛНВЦ «Західплемресурси», для кріоконсервації використовували тільки другу фракцію еякуляту.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об’ємом, активністю та концентрацією сперміїв. Для заморожування допускались еякуляти з концентрацією не менше 400 млн/мл, активністю не менше 70 % і кількістю патологічних форм не більше 15 % сперміїв. Еквілібрацію проводили за температури 5 ºС протягом 120 хв. Заморожування сперми здійснювали в соломинках об’ємом 0,25, 0,5, 2 і 4 мл (IMV, Франція) діаметром 2, 2,8, 5 і 7 мм відповідно, на програмному заморожувачі Planer R204 (Великобританія) за програмою: від +5 °С до –6 °С при 3 °С/хв, автосідінг при –6 °С (витримували 60 с), від –6 °С до –140 °С при 20 °С/хв. Після закінчення програми заморожування, соломинки переносили у рідкий азот (–196 °С). Деконсервацію сперміїв здійснювали у водяній бані при режимах: 37 ºС впродовж 30 с, 50 ºС — 12 с та 70 ºС — 8 с. Для дослідження відбирали зразки плазми з подальшим проведенням біохімічних досліджень після розморожування. Для кріоконсервації сперми кнурів використовували середовище, розроблене у Всеросійському Інституті тваринництва [1, 5]. Відділення середовища від сперміїв для вивчення у ньому активності ферментів проводили шляхом центрифугування 15 хв при 7000 g.

Активність АсАТ у 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 з товщиною оптичного шляху 10 мм (300 мкл у лунці).

Для оцінки цілісності акросом використовували визначення активності дифундованого ферменту КФ з акросом. Активність КФ у плазмі/середовищі визначали за допомогою набору для визначення кислої фосфатази уніфікованим методом («Витал Диагностикс СПб» Санкт-Петербург, Россия) згідно з інструкцією виробника. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Sumal PE-2 (Carl Zeiss, Німеччина) в тестових планшетах (96 лунок), при довжині хвилі 405 нм з товщиною оптичного шляху 10 мм (300 мкл у лунці). Виживання сперміїв визначали інкубуванням зразків у термостаті за температури 37 °С. Кожних 30 хв оцінювали загальну рухливість

сперміїв і підраховували час до повного припинення руху. Статистичний аналіз результатів досліджень здійснювали з використанням пакету програм Statistica 7 (StatSoft, США).

Результати й обговорення

Встановлено, що активність дифундованої 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 ºС. Але встановлено вірогідно нижчу активність ферменту відносно до сперми, яка була заморожена у соломинках діаметрами 5 і 7 мм. Проте, активність АсАТ у середовищі після деконсервації сперми кнурів при 50 ºС, яка була заморожена у соломинках діаметром 2,8 мм, була на 14,8 % нижчою порівняно зі спермою, замороженою у соломинках з аналогічним діаметром, але розмороженою при температурі 37 ºС, та на 24,6 % нижчою від сперми, яка зберігалася у соломинках з аналогічним діаметром і розморожувалась при температурі 70 ºС (табл. 1).

Таблиця 1

Активність АсАТ у середовищі за різних діаметрів соломинок та температури деконсервації мкмоль/(год х 10^8, M±m, n=8)

Діаметр соломинок, мм	Температури деконсервації		
	37 ºС	50 ºС	70 ºС
2	61,03±2,7	48,27±2,1	76,07±4,3
2,8	54,44±4,08	46,18±2,8[b]	61,13±2,8
5	78,75±3,8[a]	80,1±4,6[a]	78,69±3,4
7	89,69±2,7[a]	78,75±4,3[a]	70,5±4,2

Примітка: у цій та наступних таблицях:[a]— вірогідна різниця між діаметрами соломинками при $p<0,05$, [b]— вірогідна різниця між режимами деконсервації при $p<0,05$

При температурі розморожування 70 ºС не виявлено вірогідної різниці в активності ферментів між всіма досліджуваними діаметрами, що свідчить про значний ушкоджувальний вплив швидкого режиму розморожування на спермії кнура.

При вивченні ступеня ушкодження акросом сперміїв за допомогою маркерного фермента КФ було показано, що при температурі розморожування 37 ºС не встановлено вірогідної різниці між діаметрами соломинок 2 і 2,8 мм, тоді як використання соломинок з діаметром 5 і 7 мм призвело до вірогідно вищої активності КФ порівняно з соломинками 2 і 2,8 мм (табл. 2). Зокрема, порівняння соломинок 5 та 2,8 мм і 5 та 2 мм показало вірогідно вищу активність — на 62,6 і 37,3 % відповідно, а соломинок 7 та 2 мм і 7 та 2,8 мм — на 94,8 і 130,7 % відповідно, що свідчить про значне ушкодження акросом при 37 ºС із застосуванням соломинок з діаметром 5 та 7 мм.

Таблиця 2

Активність КФ у середовищі за різних діаметрів соломинок та температури деконсервації мкмоль/(с х 10^8сперміїв, M±m, n=8)

Діаметр соломинок, мм	Температури деконсервації		
	37 ºС	50 ºС	70 ºС
2	1,93±0,09	1,31±0,07[b]	2,21±0,11
2,8	1,63±0,08	1,27±0,06[b]	1,96±0,1
5	2,65±0,13[a]	3,53±0,18[a]	2,54±0,13[a]
7	3,76±0,19[a]	3,45±0,17[a]	2,91±0,14[a]

Схожа тенденція спостерігалась і при інших досліджуваних режимах розморожування для соломинок з діаметром 5 та 7 мм, але при порівнянні соломинок 2 та 2,8 мм за різних температур, то активність КФ при 50 ºС була вірогідно нижчою, ніж при 37 ºС і 70 ºС. Порівнюючи активність КФ при застосуванні соломинок 2 і 2,8 мм та 50 і 37 ºС, встановлено, що вона була нижчою на 47,3 і 22,08 % відповідно, а при використанні соломинок 2 і 2,8 мм та 50 і 70 ºС — на 68,7 і 54,3 % відповідно.

Спермії, заморожені у соломинках

діаметром 2,8 мм, показали найвищі результати виживання при температурі розморожування 50 ºС і становили 7,6 год (табл. 3). Спермії, які були заморожені у соломинках діаметром 7 мм, показали найнижчі результати виживання і становили 4 год при 37 ºС.

Час виживання сперміїв дещо зріс при 50 ºС до 5 год і знизився при 70 ºС, але не на вірогідну величину. Виживання сперміїв, заморожених у соломинках діаметром 2 мм, залишилась незмінною при 37 і 50 ºС і становила 5 год ($p<0,05$), але вірогідно знизилась при температурі 70 ºС і становило 4 год.

Таблиця 3

Виживання сперміїв при різних діаметрах соломинок та температурах деконсервації, год (M± m, n=8)

Діаметр соломинок, мм	Температури деконсервації		
	37 ºС	50 ºС	70 ºС
2	5,2±1,7	5,1±2,1	4,3±2,1[ab]
2,8	6,1±1,4	7,6±2,9[a]	5,4±2,5
5	4,7±2,1	5,8±1,8	5,5±2,6
7	4±0,9[a]	5,3±2,3	5,1±1,9

Висновки

1. Оптимальними режимами деконсервації сперми кнура є температура 37 ºС з експозицією 30 с та температура 50 ºС протягом 12 с при застосуванні соломинок діаметром 2 і 2,8 мм. Найбільш ефективним для заморожування сперми кнура є діаметр соломинок 2,8 мм у порівнянні з діаметрами 2, 5 і 7 мм.

2. Активність ферментів АсАТ і КФ була найнижчою після деконсервації сперми кнурів при застосуванні соломинок з діаметром 2 і 2,8 мм та температури розморожування 50 ºС, що свідчить про краще збереження цілісності плазматичних мембран і акросом сперміїв при застосуванні цього поєднання діаметра соломинки і температури розмороження у порівнянні з іншими дослідними зразками.

3. Застосування соломинок 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 заплідненістю свиноматок і досліджувальних діаметрів соломинок для заморожування сперми кнура.

1. Eskyn H. V., Naryzhnyi A. H., Pokhodnia H. S. *Teoryia i praktyka yskusstvennoho osemenenyia svynei svezhevziatoi i zamorozhennoi spermoi [The theory and practice of artificial insemination of pigs fresh semen and frozen sperm]*. Monohrafyia, 2007, Belhorod, Vezelytsa. P. 253 (in Russian).

2. Nauk V. A. *Struktura i funktsyia spermyev selskokhoziaistvennykh zhyvotnykh pry kryokonservatsyy [Structure and function sperm domestic animals at cryopreservation]*. Kyshynev, 1991. 198 (in Moldova).

3. Kononov V., Holushev N., Khachapurydze E. Sredu dlia zamorazhyvanyia spermu [Extender for cryopreservation of boar sperm]. *Svynovodstvo — Pig industry*, 1975, vup. 11, pp. 25–26 (in Russian).

4. Kurbatov A. D., Platov E. V., Korban N. V., Moroz L. H., Nauk V. A. *Kryokonservatsyia spermy selskokhoziaistvennukh zhyvotnukh [Semen cryopreservation of domestic animals]*. L., Ahropromyzdat Lenynhr. otd-nye, 1988. p. 256 (in Russian).

5. Eriksson B. M. and Rodriguez-Martinez. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat-Packs and Maxi-straws. h i m *Reprod. Sci*., 2000: 63: 205–220.

6. Bwanga C. O., Ekwall H., Rodriguez-Martinez H. Cryopreservation of boar semen ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 32, no. 4, 1991. pp. 463–471.

7. Weitze K. F., Rath D., and G. Baron. New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, vol. 94, no. 8, 1987, pp. 485–488.

8. Mwanza A. and H. Rodriguez-Martinez. Post-thaw motility, acrosome morphology and fertility of deep frozen boar semen packaged in plastic PVC-bags. *Biomedical Research*, vol. 4, 1993, pp. 21–29.

Стаття надійшла до друку 03.06.2013 р.