УДК 636.4:612.616:57.086.13

ЯКІСТЬ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ КНУРІВ ЗАЛЕЖНО ВІД СПОСОБІВ ЇЇ ЗАМОРОЖУВАННЯ

Корбецька О. О., м.н.с.
Інститут біології тварин НААН, м. Львів

Наведено результати вивчення впливу різних способів заморожування на якість деконсервованої сперми кнурів. Встановлено, що кріоконсервація сперми кнурів у програмному заморожувачі забезпечила вищу активність сперміїв і цілісність плазматичних мембран після деконсерваціїї в порівнянні з заморожуванням в азотній ванні. Однак, окремі кінематичні показники сперміїв (VAP, VSL і VSL) були нижчими, ніж при швидкому заморожуванні у в азотній ванні.

Ключові слова: **сперма, кнур, заморожування, програмний заморожувач, азотна ванна, деконсервація.**

Важливим технологічним прийомом у свинарстві є відтворення і селекція тварин, одним зі способів інтенсифікації якого є штучне осіменіння, що є важливим інструментом для покращення світової популяцій свиней [1, 2].

Режим охолодження та відтавання є найбільш критичним і значно впливає на кріовиживання сперміїв і є визначальним для розробки оптимального методу кріоконсервації сперми. Більше того, спермії від різних видів неоднаково реагують на заморожування-відтавання, вимагаючи індивідуального підходу до кожного з них. Встановлення швидкості проникності води, використовуючи диференційну скануючу колориметрію, підтвердило, що оптимальною швидкістю заморожування для сперми кнурів є 30 °С/хв при використанні стандартних концентрацій гліцерину [3]. Проте, досліджень з вивчення впливу розморожування на кріовиживання сперміїв недостатньо. Відомо, що відповідь або реакція сперміїв на відтавання залежить від використаної швидкості охолодження. При охолодженні зі швидкістю 30 °С/хв, швидке відтавання при 1200 °С/хв забезпечило найвищі результати [4]. Використовуючи ці режими, охолодження і відтавання, прийнятне виживання сперми після кріоконсервації (>50 %) забезпечується у більшості кнурів [4, 5].

Для заморожування сперми кнурів у дослідних лабораторіях, як правило, використовують високовартісні програмні заморожувачі суспензій клітин. Однак, це не сприяє розповсюдженню і популяризації використання кріоконсервованої сперми кнурів і вимагає пошуку шляхів здешевлення технології і, зокрема, заморожування сперми. Тому, вивчення якості сперми кнурів після заморожування в програмному заморожувачі та заморожування в парах азоту є актуальним. Використання біологічних заморожувачів для кріоконсервації сперми кнурів є достатньо обмеженим і заморожування в соломинках, як правило, проводиться шляхом розміщення соломинок горизонтально на різних відстанях від поверхні рідкого азоту чи опущення соломинок всередину посудини Дьюара в кілька етапів. Хоча на сьогодні, найбільш прийнятною швидкістю заморожування сперми кнурів є ~ 30 °С /хв, проте результати різних досліджень важко порівнювати тому, що експерименти ніколи не є однаковими, а різниця полягає у складах середовищ, поетапності додавання гліцерину, комбінації кінцевої концентрації чи температури розморожування [6,7,8].

Метою наших досліджень було вивчення якості деконсервованої сперми кнурів залежно від способів заморожування (у програмному заморожувачі і

азотній ванні), порівнюючи їх результативність по показниках характеру руху, активності та збереженості плазматичної мембрани.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проведені у Львівському НВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення тварин Інституту біології тварин НААН. 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 на сухому збалансованому раціоні. Сперму відбирали мануально на чучело з режимом використання 2 рази на тиждень. Для досліджень використовували тільки першу та другу фракції еякуляту. Після взяття сперма поміщалась в термоконтейнер, та впродовж 60-80 хв доставлялася в лабораторію для оцінки та подальшої технологічної обробки.

Свіжоотримані еякуляти оцінювали за об'ємом (мл), активністю (%) та концентрацією сперміїв. Для заморожування відбирали еякуляти з концентрацією сперміїв не менше 200 млн/мл, з активністю не менше 70 % і з кількістю патологічних форм не більше 15 %.

Перед заморожуванням розбавлену, охолоджену (5 ^{o}C) та витриману (180 хв) сперму фасували в соломинки об'ємом 0,5 мл (IMV, Франція). Вільний кінець запаювали пристроєм для запайки соломинок (Maestro, Китай). Половину соломинок, отриманих з кожного еякуляту, розміщували горизонтально на решітці в азотній ванні на 5 см над поверхнею рідкого азоту впродовж 20 хв, після чого занурювали у рідкий азот і переносили в посудину Дьюара для подальших досліджень. Другу половину соломинок поміщали в тримачі програмного заморожувача клітин Cell Frezer R204 (Planer, Великобританія) і розташовували в камеру заморожувача, в якій попередньо налаштована стартова температура 5 °С. Заморожували в камері за режимом: від 5 °С до мінус 6 °С при мінус 3 °С/хв, при мінус 6 °С утримували 60 с та від мінус 6 °С до мінус 140 °С при мінус 20 °С/хв. Після завершення програми, соломинки переносили з камери заморожувача в пінополістиролову ванну з рідким азотом і переносили в посудину Дьюара для зберігання та подальших досліджень.

Відтавання зразків сперми проводили у водяному термостаті при 37 °С упродовж 30 с. Після розморожування соломинки насухо витирали фільтрувальним папером від води і вмістиме переносили в пробірки та додавали середовище для розморожування.

Рухливість сперміїв визначали нанесенням краплі сперми на попередньо підігріте предметне скло, накривали покривним скельцем на підігрівному столику (з температурою 37 °С) методом фазово-контрастної мікроскопії на мікроскопі МБИ-15-2 (ЛОМО, СРСР) при збільшенні х 400. Активність сперміїв виражали у відсотках сперміїв з прямолінійним поступальним рухом від загальної кількості.

Об'єктивну оцінку характеру руху сперміїв проводили в Львівському НВЦ "Західплемресурси" на системі Sperm Vision (Minitube, Німеччина). За допомогою даної системи проводили автоматичне визначення рухливості сперміїв, об'єктивну і оптимальну за часом можливість визначення якості сперми. Автоматичним дозатором після розморожування відбиралось 20 мкл сперми і поміщалось в камеру Leja (IMV, Aigle, Франція), яка попередньо була підігріта до 37 °С. Дослідження рухливості деконсервованих сперміїв проводили під мікроскопом Olympus (Японія), методом позитивного фазового контрасту, при збільшенні × 200. П'ять полів зору були вибрані на поверхні камери, і вираховували середній результат. Швидкість камери налаштовували на 20 кадрів в секунду [9, 10].

Цілісність плазматичних мембран визначали тестом гіпоосмотичного набрякання сперміїв (ТГОНС), а саме: у пробірку вносили 10 мкл досліджуваної сперми і 100 мкл гіпотонічного розчину, перемішували і ставили в термостат при 37 ºС на 30 хв [11]. Досліджували на фазово-контрастному мікроскопі при загальному збільшенні х 400. Підраховували щонайменше 200 сперміїв, ділячи їх на дві групи: спермії з закрученими хвостами (з неушкодженими мембранами) і спермії з рівними хвостами (з ушкодженими мембранами), виражаючи другі у відсотках.

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

Результати досліджень. Одразу після заморожування, як і на кожному етапі дослідження, була проведена оцінка активності сперміїв упродовж інкубації після деконсервації, порівнюючи два способи заморожування. Динаміка зниження активності сперміїв після використання двох способів заморожування різнилася на 4,6-9,1 %, з повільнішою динамікою зниження активності при використанні програмного заморожувача (табл. 1). Індивідуальні особливості кожного кнура-донора сперми та кореляція між особливостями кнурів та методом заморожування була вірогідна протягом всього періоду інкубації (r =0,91; $p<0,05$).

Таблиця 1

Активність сперміїв після деконсервації та упродовж 8 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M±m

Спосіб заморожування	Тривалість інкубації після деконсервації, год								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Азотна ванна	62,7± 5,2	43,2± 6,8	42,8± 6,2	34,1± 6,4	29,3± 6,3	28,5± 6,9	15,6± 5,2	9,0± 3,8	5,0± 2,9
Програмний заморожувач	68,7± 4,8	50,9± 6,2	51,5± 7,4	43,1± 6,0	30,2± 7,3	28,4± 6,5	20,0± 6,2	16,1± 6,3	6,3± 2,9

Дослідженнями кінематичних показників розморожених сперміїв встановлено, що одразу після деконсервації загальна активність сперміїв була вірогідно вищою у зразках, заморожених у програмному заморожувачі, тоді як кількість сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом (ППР), хоча і була вищою, але не мала вірогідної різниці, ($p<0,05$; табл. 2).

На відміну від цього показники VAP, VSL і VCL були вірогідно вищі у зразках, заморожених в азотній ванні ($p<0,05$). Показники BCF, STR і LIN вірогідно не відрізнялися між двома способами заморожування ($p>0,05$). Після 2 год інкубації показники VAP, VSL і VCL були вірогідно вищими ($p<0,05$) при заморожуванні сперми кнурів в азотній ванні порівняно з використанням програмного заморожувача. У той же час активність сперміїв при застосуванні заморожувача була на 19,8 %, а кількість сперміїв з ППР – на 19,2 % більша, ніж при заморожуванні сперми в азотній ванні. За іншими параметрами спостерігали аналогічну тенденцію, яка була після розморожування. Індивідуальні особливості кнурів чинили вірогідний вплив на всі кінематичні параметри за винятком STR і LIN.

Таблиця 2

Кінематичні показники сперміїв після деконсервації та через 2 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M±m)

	Кінематичні характеристики								
	Ак-тив-ність,	**ППР, %**	**VAP, мкм/с**	**VSL, мкм/с**	**VCL, мкм/с**	**ALH, мкм**	**BCF**	**STR, %**	**LIN, %**
0 год									
Азотна ванна	49,8± 4,6	41,3± 5,1	116,9± 2,9*	109,5± 2,8*	154,7± 3,3*	5,3± 0,2	26,9± 0,8	91,5± 0,5	71,0± 1,3
Програмний заморожувач	64,8± 3,4*	51,1± 3,2	103,1± 3,7	94,9± 3,6	136,7± 4,9	5,0± 0,2	25,6± 0,6	90,5± 0,8	70,1± 1,6
2 год									
Азотна ванна	30,3± 5,7	16,7± 3,9	105,8± 6,3*	86,0± 5,7*	185,1± 8,6*	8,3± 0,3	22,4± 1,0	80,2± 1,0	48,3± 1,5
Програмний заморожувач	36,3± 4,8	19,9± 3,3	92,3± 5,1	75,4± 4,3	157,0± 8,2	7,4± 0,3	23,4± 1,2	81,2± 0,7	50,6± 1,3

*Примітка. * — p<0,05, вірогідна різниця.*

Кількість сперміїв з неушкодженою плазматичною мембраною у процесі інкубації вірогідно знизилась при використанні двох досліджуваних способів заморожування сперми, проте збереженість плазматичних мембран була вірогідно вищою у зразках, заморожених на програмному заморожувачі (p<0,05; табл. 3).

Таблиця 3

Цілісність плазматичних мембран сперміїв після деконсервації та через 2 год інкубації при 38 °С, %, n=6, M±m

Методи заморожування	Збереженість плазматичних мембран, %
Азотна ванна	46,5 ± 4,0
Програмний заморожувач	61,7 ± 2,8*

*Примітка. * — p<0,05, вірогідна різниця.*

При застосуванні однакового середовища і протоколу кріоконсервації сперми, повільна швидкість заморожування негативно вплинула на активність сперміїв у порівнянні із вищою швидкістю [12,13,14]. Однак, повільна швидкість заморожування сперміїв забезпечує вищу кількість сперміїв з неушкодженою плазматичною мембраною. В експериментах, проведених іншими дослідниками [15,16], за швидкого заморожування активність сперміїв не була вищою одразу після розморожування, але залишалась вищою протягом тривалішого часу при температурі інкубації 38 °С. У нашому дослідженні повільна швидкість заморожування показала свої переваги у порівнянні до швидкого як за активностю сперміїв, так і за цілісністю плазматичних мембран. Однак, швидкість сперміїв (VAP, VSL, VCL) і латеральне зміщення головки (ALH) було вищим у зразках сперми, заморожених з вищими швидкостями. Як ці параметри можуть вплинути на запліднюючу здатність сперміїв кнура потрібно вивчати додатково.

Висновки. Застосування програмного заморожувача для кріоконсервації сперми кнурів забезпечує вищу активність сперміїв упродовж 8-годинного інку-

бування після розморожування (4,6-9,1 %) порівняно з використанням азотної ванни. При повільному заморожуванні сперми кнурів (використання програмного заморожувача) активність деконсервованих сперміїв зросла на 14,6 % ($p<0,05$), кількість сперміїв з прямолінійно-поступальним рухом на 9,7 %, збереженість плазматичних мембран – на 13,3 % ($p<0,05$), порівняно із використанням азотної ванни. Швидке заморожування сперми кнурів призводить до вірогідного зростання кінематичних показників сперміїв (VAP, VSL, VCL) після деконсервації.

Бібліографічний список

1. Наук В. А. Структура и функция спермиев селькохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев. — 1991. — С.198.

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

3. Fiser P. S. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level / P. S. Fiser, R. W Fairfull, C. Hansen, P. L Panich, J. N. Shrestha, L. Underhill // Mol. Reprod. Dev. —1993. — V. 34 — P.190–5.

4. Hess E. A. Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedure / E. A. Hess, T. M. Ludwick, H. S.Teague // J. Anim. Sci. — 1960— V. 19. — P. 926–31.

5. Hernandez M. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability / M. Hernandez, J. Roca, M. A. Gil, J. M. Vazquez, E. A. Martinez // Theriogenology — 2007. — V.67:14 — P. 36–45.

6. Medrano A. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation / A. Medrano // Ph.D. Thesis, University of London, UK. — 1998.

7. Thurston L. M. An investigation into sources of variation and the genetic basis of boar spermatozoa survival following cryopreservation / L. M. Thurston // Ph.D. Thesis. University of London, London, UK; — 2000.

8. Roca J. Factors influencing boar sperm cryosurvival / M. Hernandez, G. Carvajal, J. M. Vazquez, E. A., Martinez // J. Anim. Sci. — 2006 — V. 84. — P. 2692–9.

9. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; // за ред. В. В. Влізла. — Львів: СПОЛОМ, 2012. — С. 539-540.

10. Holt C. Choice of operating conditions to minimise sperm sub-population sampling bias in the assessment of boar semen by computer-assisted semen analysis / C. Holt, W. Holt, V. Moor // J. Andro l. — 1996. — V. 17. — P. 587–95.

11. Jiang Z. Cryobiology / Z. Jiang, et al. // Cryobiology. 2007. — V. 54 — P. 301–304.

12. Woelders H. Boar variation in ‘‘freezability’’ of the semen / H.Woelders, A. Matthijs, M. Den Beston // Reprod. Domest. Anim. — 1996. —V.31.— P.153–9.

13. Pribenszky C. Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa / C. Pribenszky, M. Molnar, A. Horvath, A. Harnos, O. Szenci // Reprod. Fertil. Dev. — 2006. — V.18. — P.162–163.

14. Parks J. E. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes / J. E. Parks, J. K. Graham // Theriogenology —1992. — V.38. — P.209–222.

15. Hofmo P. O. Development and commercial use of frozen boar semen in Norway. / P. O. Hofmo, I. S. Grevle // In: Boar Semen Preservation IV. — 2000. —

Р. 71–7.

16. Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends / M. Yoshida // Anim. Reprod. Sci. — 2000. V.60-61. — P.349–55.

КАЧЕСТВО ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ ХРЯКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ЕЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Корбецкая О.О., Институт биологии животных НАА, г. Львов.

Приведены результаты изучения влияния замораживания в программном замораживателе и в азотной ванне на качество деконсервированной спермы хряков. Установлено, что криоконсервация спермы хряков в программном замораживатели обеспечила высшую активность спермиев и целостность плазматических мембран по сравнению с азотной ванной. Однако, отдельные кинематические показатели спермиев (VAP, VSL и VSL) были ниже, при быстром замораживании в азотной ванне.

Ключевые слова: сперма, хряк, замораживания, программный замораживатель, азотная ванна, деконсервация.

THE QUALITY OF THAWED BOAR SEMEN DEPENDING ON CRYOPRESERVATION METHOD

Korbetska O., Institute of Animal Biology NAAS

The study results of the influence of different methods of cryopreservation (program cell freezer and LN bath) on boar sperm quality after thawing have been shown. Found that boar semen cryopreservation in the program freezer provided higher progressive motility and plasma membrane integrity than LN bath. However, some sperm kinematic parameters (VAP, VSL and VSL) were lower with rapid freezing in a liquid nitrogen bath.

Keywords: sperm, boar, cryopreservation, program freezer, nitrig bath, thawing.

УДК 636.7:612.616;57.086.13; 547.458

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ МЕМБРАН І АКРОСОМ СПЕРМІЇВ СОБАК У ПРОЦЕСІ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ ПРИ РІЗНИХ ЦУКРАХ У СКЛАДІ СЕРЕДОВИЩА

Корбецький А.Р., пров. фах.
Інститут біології тварин НААН, м. Львів

У статті наведено результати вивчення впливу моно-, ди- та трисахаридів у складі середовища для кріоконсервації сперми собак на активність сперміів, цілісність їх плазматичних і акросомальних мембран. Встановлено, що найвищі показники активності сперміів після деконсервації були отримані при додаванні до середовища фруктози, ксилози і трегалози. Найбільше зниження активності сперміів після розморожування встановлено при додаванні до середовища для кріоконсервації таких цукрів, як сахароза (38,6 %) і глюкоза (47,9 %). При використанні дослідних зразків середовищ для заморожування сперми собак, у склад яких входила фруктоза, ксилоза і трегалоза, спостерігали вищий рівень активності сперміів після розморожування, менший відсоток сперміів з ушкодженою плазматичною мембраною, порівняно з іншими дослідними групами, що свідчить про кращу мембранопротекторну дію даних середовищ.