УДК 636.1.082.453.5

УШКОДЖЕННЯ МЕМБРАН СПЕРМІЇВ ЖЕРЕБЦЯ ПРИ РІЗНИХ МЕТОДАХ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Рецензенти: док-р. біол. наук, професор Бугров О.Д.; канд. с.-г. наук Шигимага В.О.

О.Б. Сушко[1], З. Сморанг[2], М. Бохенек[2], А.Г. Міщенко[1]

[1] – Інститут тваринництва НААНУ

[2] – Інститут зоотехніки (м. Краків, Польща)

Вивчено ушкодження мембран сперміів жеребця при різних методах заморожування. Показано, що певне зростання швидкості охолодження сперми в пайєтах у діапазоні температур від 0 °С до мінус 80 °С при застосуванні прямого занурення термоблока з одночасним зрошуванням спермодоз дрібно розпиленим азотом забезпечує отримання високих фізіологічних показників та підвищення кількості сперміів із неушкодженими мембранами

Ключові слова: **сперма, жеребці, кріоконсервація, швидкість охолодження.**

Як в Україні, так і у світі на даний час існує різний рівень упровадження і застосування низькотемпературної консервації сперми різних видів сільськогосподарських тварин [1-6]. У конярстві розповсюдженість методу кріоконсервації сперми жеребців відносно не велика, у порівнянні зі скотарством та іншими галузями тваринництва. Між тим, незважаючи на технічні складнощі та науково необґрунтовані обмеження, метод кріоконсервації сперми та штучного осіменіння набуває популярності у коневласників, демонструючи при цьому як селекційно-технологічні, так і економічні переваги. Слід однак визнати, що чинником стримування впровадження методу є нестабільність результатів заморожування сперми жеребців. У зв'язку з цим проводяться дослідження, спрямовані на підвищення результативності кріоконсервації сперми та штучного осіменіння коней [7-9].

Раніше нами було розроблено метод заморожування сперми жеребців шляхом прямого занурення у зріджений азот термоблока „Кріотоп” зі спермодозами [10]. Термоблок „Кріотроп” розрахований на застосування спермодоз збільшеного об’єму, якими є шприц-тюби на 5 мл. Такі спермодози мають певні переваги при заготівлі сперми в експедиційних умовах [11]. Збільшення об’єму клітин є чинником гальмування процесу охолодження і зниження швидкості заморожування. При розміщенні спермодоз такого формату в парах азоту без використання спеціального обладнання швидкість охолодження знижується в 5-6 разів, що унеможливлює отримання високих якісних показників. Тому фактично „Кріотроп” є пристроєм, що прискорює швидкість охолодження цих спермодоз, нівелює чинник „збільшеного об’єму контейнера” і, таким чином, створює умови для замороження сперми в режимі, близькому до загальноприйнятих величин [12-13]. Представляло інтерес визначити можливість застосування методу заморожування сперми жеребця прямим зануренням термоблока в зріджений азот, з одночасним зрошуванням спермодоз дрібно розпиленим азотом, але за умови застосування як контейнерів для розміщення сперми – пайєт об’ємом 0,5 мл, які традиційно використовуються при кріоконсервації сперми у центрах, обладнаних автоматичними установками для дрібного розфасування і маркування спермодоз („IMV technologies”, „Minitub”). Тобто необхідно було випробувати заморожування в термоблоці-прискорювачі спермодоз меншого об’єму в 10 разів. Для визначення біологічної ефективності

такого технологічного підходу необхідно було провести випробування, порівнявши результати з традиційним (базовим).

Мета роботи - вивчити порівняльну біологічну ефективність використання різних методичних прийомів кріоконсервації сперми жеребця.

Матеріали та методи досліджень. Сперму одержували на ізотермічну вагіну конструкції Інституту тваринництва НААНУ [14]. Сперму заморожували після процедури відмивання від секретів додаткових статевих залоз (гелю) і видалення плазми, шляхом центрифугування при g=800, після розбавлення за загальноприйнятими методиками і виведення концентрації на 100 млн. сперміїв/мл. Розбавлення та заморожування сперми здійснювали з застосуванням середовища SMEY [15] із додаванням 2 % гліцерину. Відтавання та оцінку сперми проводили при температурі 37 ^{o}C. Встановлювали рухливість у відсотках, виживаність в годинах, а також ступінь ушкодження мембран статевих клітин. Для визначення ступеня ушкодження мембранного апарата сперміїв після заморожування застосовувалося подвійне фарбування вітальними фарбниками SYBR-14 і пропідіум йодид (PI) за методикою Weaver J.L. [16]. Використовувався проточний цитометр DAKO Galaxy при довжині хвилі 488 нм для збудження флюоресценції клітин. При цьому за ступенем ушкодження мембран спермії, відповідно до методики, розділялися на три умовні категорії: «живі», тобто з неушкодженими мембранами; «ушкоджені», тобто спермії з частково порушеним мембранним апаратом і «мертві», тобто спермії з сильно ушкодженими, зруйнованими мембранами. Загальна кількість оцінюваних клітин становила 25 тисяч за один аналіз.

Біометричне опрацювання результатів здійснювали за загальноприйнятими методиками [17] із використанням програми Excel. При цьому достовірність різниці для показників рухливості та виживаності розраховували за методикою оцінки генеральної середньої, а для показників цитометричних досліджень – за методикою оцінки генеральних часток (з урахуванням того, що цитометр оцінює кожну клітину персонально і відносить до однієї з категорій).

Базовий метод полягав у розміщені пайєт у парах зрідженого азоту при мінус 130 ^{o}C, що досягалось на відстані 4 см від поверхні зрідженого азоту (рис. 1). При експериментальному методі сперму жеребця заморожували прямим зануренням термоблока „Кріотроп” з пайєтами на 0,5 мл у зріджений азот при мінус 196 ^{o}C (рис. 2). Для уникнення попадання великих крапель розпиленого азоту на оболонку пайєт, що могло негативно впливати на якісні показники спермодоз, термоблоки додатково закривали ситами з діаметром перфорації 1 мм.

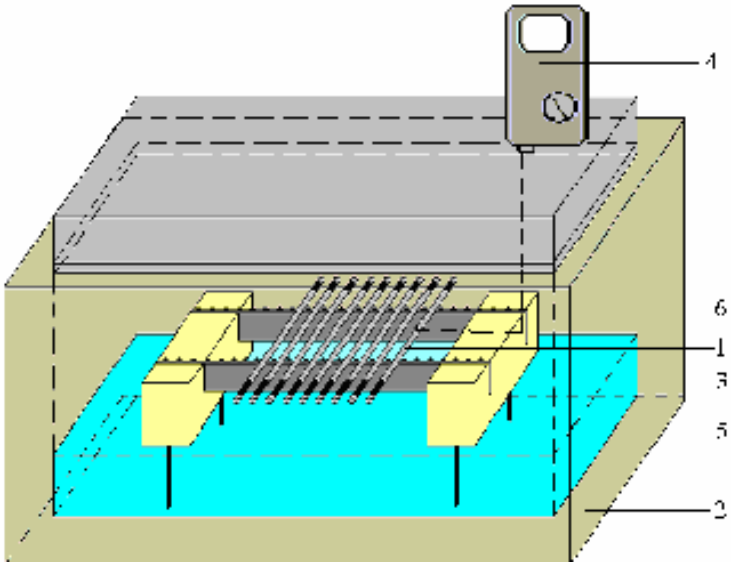


Рис. 1. Модель загальноприйнятого способу заморожування сперми в пайєтах об’ємом 0,5 мл: 1 - пайєти, 2 - термоізолююча камера, 3 - штатив для пайєт, 4 - прилад для вимірювання температури, 5 - зріджений азот, 6 - пари азоту.

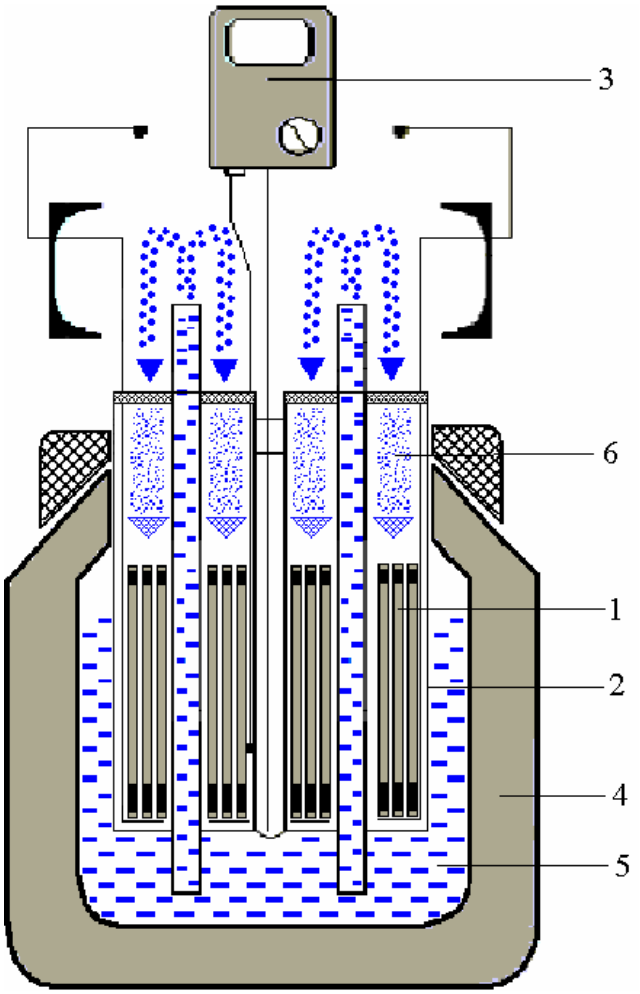


Рис. 2. Заморожування сперми в пайєтах об'ємом 0,5 мл за допомогою пристрою "Кріотроп" прямим зануренням у зріджений азот: 1 - пайєти, 2 - термоблок „Кріотроп", 3 - прилад для вимірювання температури, 4 - посудина Дюара, 5 - зріджений азот, 6 – дрібно розпилений азот.

Результати досліджень. Проведено порівняльне вивчення ступеня ушкодження мембран сперміїв жеребця та основних фізіологічних показників при двох принципово різних технологічних підходах заморожування сперми. Термоблоки пристрою "Кріотроп" реалізували двохшвидкісний режим охолодження сперми (від 0 °С до мінус 10 °С) зі швидкістю 15-16 °С/хв, від мінус 10 °С до мінус 80 °С зі швидкістю 111-115 °С/хв при використанні пайєт (центр). При заморожуванні в парах, де ці швидкості становили 8-10 °С/хв (від 0 °С до мінус 10 °С) та 23-26 °С/хв (від мінус 10 °С до мінус 80 °С). Середня швидкість охолодження за обома температурними діапазонами становила відповідно 19–20 °С/хв при охолодженні у парах азоту, та 65–69 °С/хв при охолодженні термоблоків у зрідженому азоті. Після охолодження до температури мінус 80 °С, тобто температурного порогу, після якого зникає рідка фаза, спермодози переносили для зберігання до кріосховища зі зрідженим азотом (мінус 196 °С). Представляло інтерес те, що при застосуванні методу заморожування, який полягав у прямому внесенні термоблока в зріджений азот з одночасним зрошуванням пайєт дрібно розпиленим азотом, виникали швидкості охолодження значно більші, ніж існуючі при загальноприйнятому методі (рис. 3).

Вивчення біологічних характеристик заморожено-відталої сперми жеребця з використанням методів проточної цитометрії та інших біотехнологічних методик показало несподівані результати за ступенем ушкодження мембран сперміїв жеребця після заморожування за різними технологічними прийомами. Так, не зважаючи на високі швидкості охолодження пайєт у термоблоках пристрою „Кріотроп", отримано результати, що були не тільки не гірші, як очікувалось, а навіть вищими за контрольні (табл.).

При застосуванні обох методів показники рухливості й виживаності сперми мали високий рівень. Статистично достовірної різниці між базовим і експериментальним методом виявлено не було.

Також дослідження показали, що процент живих клітин, із неушкодженою мембраною, в контролі був нижчим на 3,67 %, ніж при застосуванні експериментального методу.

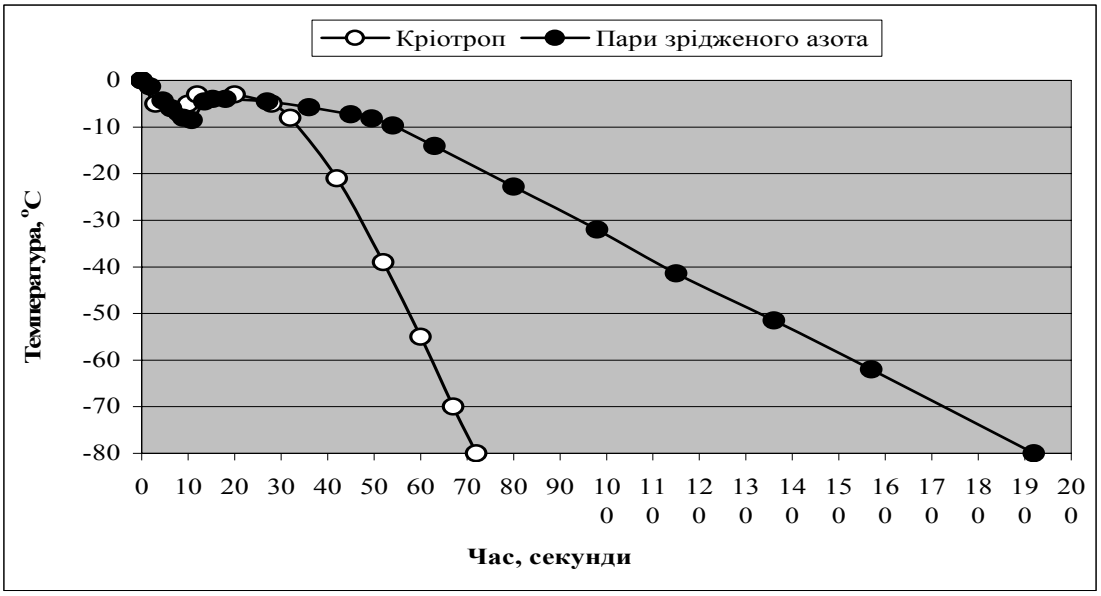


Рис. 3. Режими охолодження сперми жеребця в пайєтах при використанні різних методів кріоконсервації.

Показники якості деконсервованої сперми жеребців (M±m) при різних методах заморожування (n=5)

Показник	Базовий метод (контроль)	Експериментальний метод	Достовірність різниці
Фізіологічні характеристики			
Рухливість, %	55,83±4,10	57,00±2,12	p>0,1
Виживаність при t=37 °С, год	5,33±1,21	5,20±0,84	p>0,1
Ступінь ушкодження мембран сперміїв ($n_{кл}=25000\times n_e$)			
живі, % (M±m)	31,39±0,02	35,06±0,01	p<0,001
ушкоджені, % (M±m)	17,90±0,03	15,07±0,02	p<0,001
мертві, % (M±m)	50,70±0,03	49,86±0,02	p<0,001

Примітка: 1. n_e - кількість вивчених еякулятів в досліді;
2. $n_{кл}$ - кількість оцінених клітин (сперміїв).

Відповідно, процент клітин живих, але з ушкодженою мембраною був вищим на 2,83 %. Частка статевих клітин із сильно ушкодженою після кріоконсервації мембраною (мертвих) в контролі була більшою на 0,84 %, ніж у досліді.

Таким чином застосування проточного цитометра lf’ pvjue визначати ушкодження сперми на рівні клітини. Встановлено, що значне зростання швидкості охолодження сперми жеребця при використанні пайєт у термоблоці “Кріотроп” шляхом прямого занурення останнього в середовище зрідженого азоту не призводить до загибелі сперми жеребця, спостерігається навіть деяке достовірне покращення показників за ступенем ушкодження мембранного апарату.

Висновки:

1. Заморожування сперми жеребця в пайєтах об'ємом 0,5 мл методом прямого занурення термоблока „Кріотроп" в зріджений азот з одночасним зрошуванням спермодоз дрібно розпиленим азотом супроводжується зростанням середньої швидкості охолодження до 65-69 ^{o}С/хв, проти 19-20 ^{o}С/хв при заморожуванні в парах азоту.

2. При зростанні швидкості охолодження виявлено збільшення проценту сперміїв із неушкодженою мембраною на достовірну величину 3,67 %.

3. Рухливість і виживаність сперми жеребця, незалежно від способу заморожування (у парах, мінус 130 ^{o}С, чи зануренням термоблока „Кріотроп" в зріджений азот, мінус 196 ^{o}С). знаходились на одному рівні.

Бібліографічний список

1. Бугров А. Д. Замораживание семени быков-производителей / А. Д. Бугров // Животноводство, 1965. - № 7. - С. 70-72.

2. Бугров А. Д. Температурный шок в диапазоне температур от 0 до -196 ^{o}С и качество спермы быков и баранов / А. Д. Бугров // Доклады советских ученых на VI Международном конгрессе по размножению и искусственному осеменению животных. – М., 1968. – С. 77-80.

3. Бугров О. Д., Зверєва А. П. Режим заморожування та відтаювання сперми бугаїв / О. Д. Бугров, А. П. Звєрєва // Молочно-м'ясне скотарство: Міжв. темат. наук. зб. – К.: Урожай, 1969. – Вип. 14. – С. 7-11.

4. Бугров А. Д. Влияние замораживания на спермии быков / А. Д. Бугров // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур. – К.: Наукова думка, 1977. - № 6. – С. 8-9.

5. Осташко Ф. И., Павленко М. П., Кузнецов Г. Н. Харьковская технология криоконсервации спермы животных / Ф. И. Осташко, М. П. Павленко, Г. Н. Кузнецов // Теор. и прикл. аспекты биотехнол. - К., 1991. - С. 32-33.

6. Cassou R. La methode des paillettes en plastique adapt la generalization de la congelation / Cassou R. // C.R. Acad. Agric, 1964. - № 50. - P. 881-887.

7. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the prence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry / R. V. Devireddy, D. .J. Swanlung, T. Olin [et all] // Biology of reproduction. – 2002. - № 66. - P. 222-231.

8. Науменкова В. А. Различные подходы к решению проблем искусственного осеменения кобыл замороженным семенем: Сб. докладов научно-практ. конф. и координационного совещания, посв. 100-летию со дня рождения Скаткина П.Н. / В. А. Науменкова, О. В. Васильева // Дивово, 2004. - 179 с.

9. Osmotic stress of stallion sperm exposed to hypertonic solution of differents cryoprotectants / M. A. Alvarenga, F. O. Papa, G. H. M. Araujo [et all] // Reproduction in domestic Animals (16th Internatianal Congress on Animal Reproduction 13-17 July 2008). – Budapest, Hungary. - Vol. 43, Supplement 3, July. – 2008. - P. 98.

10. Сушко О. Б. Метод кріоконсервації сперми жеребців з використанням компактизованих шприц-тюбів / О. Б. Сушко // Вісник аграрної науки. – К.; травень, 2007. – С. 43-45.

11. Розробка технологічної лінії для отримання, кріоконсервації сперми жеребців та штучного осіменіння кобил: Матер. міжнар. наук.-практ. конф. "Тваринництво XXI сторіччя: Новітні технології, досягнення і перспективи" (приурочена 90-й річниці з дня народження Ф.Ф.Ейснера і 75-річчю Інституту

тваринництва УААН) / О. Б. Сушко, О. О. Новіков, Ф. І. Осташко [та ін.] // НТБ, №94 – ІТ УААН. – Х., 2006. – С. 325-330.

12. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко - К.: Урожай, 1978. - С. 152-157.

13. Белоус А. М. Криоконсерация репродуктивных клеток / А. М. Белоус, В. И. Грищенко, Ю. С. Паращук. – К.: Наукова думка, 1986. - С. 100.

14. Пат. 31026 від 25.03.2008 Пристрій для отримання сперми жеребців. Сушко О.Б. Новиков О.О. (u200711907, заявка від 29.10.2007, UA31026U, Бюл. № 6, 8 сторінок).

15. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours frozen / T. Backman, J. E. Bruemmer, J. K. Graham [et all] / Squires American Sociely of Animal Science. All rights reserved // J. Anim. Sci. – Vol. 82. - 2004. - P. 690-694.

16. Weaver J. L. Estimation of Cell Viability by Flow Cytometry. Methods in molecular biology / J. L.Weaver; Edited by: M. J. Jaroszeski and R. Heller. - Vol. 91, Flow Cytometry Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 1998. - P. 77-83.

17. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – Москва: Колос, 1969. - С. 36-38.

ПОВРЕЖДЕНИЕ МЕМБРАН СПЕРМИЕВ ЖЕРЕЦА ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

А.Б. Сушко[1], З. Сморанг[2], М. Бохенек[2], А.Г. Мищенко[1]

[1] – Институт животноводства НААНУ

[2] – Институт зоотехники (г. Краков, Польша)

Изучено повреждение мембран спермиев жеребца при разных методах замораживания. Показано, что определенный рост скорости охлаждения спермы в пайетах в диапазоне температур от 0 °С до минус 80 °С при применении прямого погружения термоблока с одновременным орошением спермодоз мелкораспыленным азотом обеспечивает получение высоких физиологических показателей и повышение количества спермиев с неповрежденными мембранами

Ключевые слова: сперма, жеребцы, криоконсервация, скорость охлаждения.

STALLION SPERMATOZOA MEMBRANE DETERIORATION BY VARIOUS FREEZING PRESERVATION PROCEDURES

Sushko O., Mishchenko A.; Institute of animal science, NAASU

Smorang Z., Bokhanek M.; Zoo-technical institute, Krakov, Poland

This article highlights the experimental research results on stallion spermatozoa membrane deterioration by various freezing preservation procedures. Control tube-cooled semen proved to improve physiological sperm characteristics. Non-damaged spermatozoa cell membrane number increase was observed. The successful test results from semen cooling velocity boost. Velocity ranges from 0°C to -80°C. The test was fulfilled by thermal block dip. Simultaneously semen doses were watered by nitrogen spray.

Key words: semen, stallions, freezing preservation, cooling velocity.