

## ВПЛИВ МЕТІОНІНУ І ЦИСТИНУ, ДОДАНИХ ДО СЕРЕДОВИЩА, ДЛЯ РОЗБАВЛЕННЯ І ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ КНУРІВ НА ЇЇ ЗБЕРЕЖЕННЯ

С. Б. Корнят

Інститут біології тварин УААН, м. Львів

*Наведено дані про вплив метіоніну і цистину, введених у різних кількостях до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів, на активність сперміїв протягом 4 днів зберігання, реакцію середовища та його осмотичний тиск. Показано, що введення в середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів метіоніну і цистину покращує його дію на збереження активності сперміїв протягом короткотривалого (до 3 днів) зберігання сперми кнурів та на 8,74 та 3,61 % підвищує збереження сперміїв після їхнього трьохденного зберігання. Введення в середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів цистину і метіоніну підвищувало на 3,45 та 5,26 % відповідно запліднюваність свиноматок.*

**Ключові слова:** СПЕРМА, СПЕРМІЇ, КНУР, ЦИСТИН, МЕТІОНІН, АКТИВНІСТЬ.

Розбавлення сперми кнурів, яка в подальшому використовується для штучного осіменіння свиноматок, дозволяє не тільки збільшити об'єм еякуляту, що має значення при осіменінні кількох самок одним еякулятом, а й створити захисне середовища для сперміїв поза організмом самців, фізико-хімічні і біологічні властивості якого сприяли б подовженню життя сперміїв, порівняно до нативного еякуляту та максимального збереження їх запліднюючої здатності. Проте взяття, розбавлення, транспортування і зберігання розбавленої сперми кнурів пов'язані з охолодженням сперміїв, порівняно з температурою, в якій вони перебували до еякуляції, до 20 °С за досить короткий час [1]. Розбавлена сперма кнурів зберігається в охолодженому стані, що сповільнює метаболічні процеси в сперміях і їх капациацію та сприяє тривалому збереженню цілісності акросоми сперміїв [2]. Зміни, які відбуваються в інкубованих сперміях кнура при набуванні ними стійкості до холодового шоку, остаточно не з'ясовані. Холодовий шок сперміїв пов'язують із змінами у ліпідному складі мембрани сперміїв [3]. Внаслідок різних температур топлення окремих ліпідних компонентів мембран сперміїв, частини мембрани можуть при охолодженні роз'єднуватися, що, в свою чергу, може призводити до руйнування білків мембран, що змінює їх структуру і проникність каналів [4, 5].

Набування сперміями стійкості до холодового шоку після інкубації при кімнатній температурі ряд дослідників пояснюють адсорбцією білків плазми сперми сперміями [6]. Внаслідок адсорбції білків зростає співвідношення білків до ліпідів у плазматичній мембрані сперміїв кнура і підвищується їх стійкість при охолодженні. Інший підхід для забезпечення підвищення співвідношення білків до ліпідів у плазматичних мембранах сперміїв кнурів полягає у включенні в склад синтетичних середовищ для розбавлення сперми білків або амінокислот, які були б здатні утворювати комплекси з компонентами мембрани сперміїв. Цим умовам відповідають сірковмісні амінокислоти, зокрема цистин, який відіграє важливу роль у стабілізації просторової форми білкової молекули внаслідок зв'язування її дисульфідними зв'язками [7]. Тому важливе місце серед сполук білкової природи, які додаються в середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів, займають сірковмісні амінокислоти та білки з високим вмістом цих амінокислот або амінокислоти, які містять сульфгідрильні групи, котрі стабілізують мембрану сперміїв при зберіганні і охолодженні та попереджують її капациацію [8].

Встановлена позитивна залежність між вмістом вільних тіолів (сульфгідрильних груп) у спермі та цілісності ДНК у сперміях. Протягом сперміогенезу ущільнення ядер сперматид

здійснюється завдяки послідовній заміні гістонів перехідними білками, а в кінці — багатими на вміст цистеїну протамінами. Поступове окиснення протамін-вільних сульфгідрильних чи тіолових (SH) груп до дисульфідів в епідідімусі далі посилює ущільнення ДНК сперми [9]. Неповне окиснення сульфгідрильних груп протаміну сперми при проходженні сперми через епідідімум призводить до підвищення чутливості ДНК сперми, до пошкоджень. Цілісність ДНК корелює з рівнем вільних сульфгідрильних груп в епідімальних сперматозоїдах самців багатьох видів тварин [10].

Крім того, рядом дослідників було встановлено негативну кореляцію між вмістом сульфгідрильних груп у спермі і рухливістю сперміїв при значному зростанні їхньої кількості [11]. Загальна кількість тіолів і дисульфідів сперми самців ссавців залишається сталою протягом всього періоду дозрівання сперми, але відношення вільних тіолів до загальних суттєво зменшується від тіла до хвостової частини епідідімуму [12]. Поступове окиснення тіолів сперми до дисульфідів сприяє ущільненню хроматину у сперміях і стабілізацію структури хвостової частини сперміїв та їх руху [13]. Сульфгідрильні складники сперми кнурів, такі як глутатіон і ерготіонеїн відіграють важливу роль у захисті сперміїв кнурів від окисних пошкоджень [14]. Проте вплив цистеїну і метіоніну, доданих у середовище для зберігання сперми кнурів, на активність сперміїв при зберіганні сперми поза організмом з'ясовано недостатньо. Виходячи з цього, метою цієї роботи було дослідження впливу сірковмісних амінокислот цистину і метіоніну, при додаванні їх до середовища для розбавлення сперми кнурів у різних кількостях, на активність сперміїв протягом зберігання.

### **Матеріали і методи**

Дослідження проведені на базі ТзОВ ЛНВЦ «Західплемресурси» та в умовах лабораторії біології та патології відтворення тварин Інституту біології тварин УААН. Об'єктом досліджень служила сперма кнурів-плідників порід ландрас, велика біла і дюрок віком 1–2 роки. Кнури утримувалися безвигульно в окремих клітках з глухими перегородками. Годівля тварин відповідала прийнятним нормам [15]. Сперма від кожного кнура відбиралася 7–9 разів на місяць. Еякуляти у кнурів відбиралися до ранкової годівлі мануально після садки на дерев'яне опудало, розроблене в Інституті свинарства ім. О. В. Квасницького УААН. Після зважування еякулятів та вимірювання концентрації сперміїв у них проводилося їхнє розбавлення у лабораторії середовищем «Екосперм» з додаванням сірковмісних амінокислот метіоніну і цистину. За контроль правило середовище для розбавлення і зберігання сперми «Екосперм» без добавки амінокислот. Метіонін і цистин додавали в середовище в кількості 100, 200 або 300 мг.

Дослідження впливу амінокислот на якість сперми проводилося щоденно шляхом визначення активності сперміїв, рН та осмотичного тиску в розбавленій спермії протягом зберігання. рН середовища визначали на рН-метрї 340, осмотичний тиск вимірювали осмометром ОМКА ІЦ-01. Концентрація сперміїв в еякулятах визначалася на станції штучного осіменіння свиней на спектрофотометрі SDM-5, а активність розбавленої та нативної сперми — на мікроскопі MBL-2000 та в лабораторії на мікроскопі Биолам П-1 і підігрівальному столику СН-02. Розбавлена сперма зберігалася при температурі +17–18 °С без доступу денного світла. Зразки сперми перед обстеженням старанно вимішувалися для кращого контакту сперміїв з середовищем.

### **Результати й обговорення**

У таблиці 1 наведено дані про вплив метіоніну, доданого до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм», на активність сперміїв протягом зберігання, рН, осмотичний тиск у середовищі. З наведених у таблиці даних видно, що в день взяття після розбавлення сперми дослідних кнурів в усіх досліджуваних варіантах середовищ

активність спермій була вищою на 1,5–4,6 % ніж у контролі. У наступні дні після розбавлення (1–4-й) активність спермій у першому досліді була відповідно на 3,8, 4, 8,7 і 6,7 % вищою, ніж у контрольному варіанті середовища і на третій день зберігання ця різниця була статистично достовірною.

Таблиця 1

**Вплив різних доз метіоніну, доданих до середовища «Екосперм», на збереження активності спермій при розбавленні сперми кнурів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

День зберігання	Досліджувані показники	Варіанти досліді			
		К	1	2	3
0	Активність	81,25 ± 1,25	85,0 ± 2,24	83,0 ± 1,22	82,5 ± 1,44
	Осм. тиск	301 ± 3,18	303 ± 14,91	309 ± 7,15	312 ± 9,11
	pH	6,95 ± 0,08	7,01 ± 0,03	6,97 ± 0,03	6,95 ± 0,05
1	Активність	78,75 ± 1,25	81,74 ± 1,87	79,0 ± 1,0	78,75 ± 1,25
	Осм. тиск	309 ± 12,24	311 ± 22,8	318 ± 15,89	319 ± 25,74
	pH	6,99 ± 0,09	7,09 ± 0,05	6,92 ± 0,14	7,01 ± 0,07
2	Активність	75 ± 2,04	78,0 ± 1,22	76,0 ± 1,87	75,0 ± 2,04
	Осм. тиск	319 ± 1,85	323,6 ± 1,78	326,6 ± 1,43	322,33 ± 0,33
	pH	6,92 ± 0,08	6,99 ± 0,05	6,97 ± 0,07	6,95 ± 0,03
3	Активність	67,5 ± 1,04	73,4 ± 1,83*	70,0 ± 2,24	67,5 ± 3,23
	Осм. тиск	298 ± 1,22	297,7 ± 6,41	294 ± 8,48	312,75 ± 7,46
	pH	6,92 ± 0,07	6,97 ± 0,10	6,91 ± 0,17	6,81 ± 0,13
4	Активність	63,75 ± 2,39	68,0 ± 1,58	64,0 ± 1,87	58,75 ± 1,21
	Осм. тиск	299,25 ± 9,0	287,4 ± 12,46	256,2 ± 11,59*	242,75 ± 8,46*
	pH	6,84 ± 0,07	6,92 ± 0,07	7,01 ± 0,04	6,84 ± 0,09

*Примітка:* у цій та наступних таблицях \* — статистично достовірні різниці в досліджуваних показниках у дослідних зразках сперми порівняно до контрольної: \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$ .

Осмотичний тиск у дослідних зразках сперми мало відрізнявся від контрольних зразків протягом чотирьох днів зберігання так само, як і реакція середовища, проте закислення середовища в дослідних зразках відбувалося дещо повільніше.

У другому досліді активність спермій у дослідних зразках сперми протягом 1–4-го дня зберігання була на 0,3, 1,3, 3,7 і 7,9 % вищою, ніж у контролі, проте ці різниці були статистично недостовірними ( $P \leq 0,5$ ). Реакція середовища у дослідному і контрольних зразках не мала значних різниць так само, як і осмотичний тиск ( $P \leq 0,05$ ). Проте на четвертий день зберігання осмотичний тиск у дослідному зразку був на 14,4 % меншим, порівняно з контролем і ця різниця була статистично достовірною ( $P < 0,05$ ). У третьому досліді активність спермій у дослідних зразках сперми була приблизно однаковою з контролем, але на четвертий день зберігання вона була на 7,9 % меншою. Зміни в реакції середовища та осмотичному тиску були аналогічними до другого досліді і на четвертий день зменшення осмотичного тиску в дослідному зразку становило 18,9 % порівняно з контролем і ця різниця була статистично достовірною ( $P < 0,05$ ).

У таблиці 2 наведено дані про вплив різних доз цистину, при додаванні його до середовища «Екосперм», на активність сперми протягом 4 днів зберігання, її осмотичний тиск та реакцію. З наведених даних видно, що дещо краще, порівняно з контролем, вплинув на активність спермій тільки перший варіант дослідного розбавника. Так, активність спермій у 1-му дослідному варіанті протягом 1–4-го дня зберігання була відповідно на 3,1, 2,1, 3,6 і 2,7 % більша, ніж у контролі, проте ці різниці статистично недостовірні ( $P \leq 0,5$ ). У другому і третьому варіантах активність сперми, порівняно з контролем, була нижчою, що можна пояснити негативним впливом високих концентрацій сірки в середовищі для розбавлення і зберігання сперми кнурів на життєздатність спермій, що узгоджується з даними інших авторів.

Таблиця 2

**Вплив різних доз цистину, доданих до середовища «Екосперм», на збереження активності спермійв при розбавленні сперми кнурів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

День зберігання	Досліджувані показники	Варіанти досліджу			
		К	1	2	3
0	Активність	70 ± 2,31	71,8 ± 2,24	68,18 ± 2,17	67,5 ± 0,94
	Осм. тиск	301 ± 3,58	309 ± 2,61	311 ± 8,65	314 ± 4,51*
	pH	6,82 ± 0,02	6,92 ± 0,03	6,95 ± 0,03*	6,99 ± 0,02**
1	Активність	65,0 ± 5,74	67,0 ± 5,58	62,73 ± 2,89	61,25 ± 0,82
	Осм. тиск	333,62 ± 3,35	329,5 ± 2,82	328,5 ± 3,94	329,75 ± 3,54
	pH	6,87 ± 0,05	7,01 ± 0,08	6,86 ± 0,09	6,82 ± 0,06
2	Активність	64,12 ± 3,77	65,5 ± 3,11	62,27 ± 4,83	61,25 ± 3,51
	Осм. тиск	333,75 ± 3,96	326,62 ± 1,99	323,5 ± 1,41	328,75 ± 1,21
	pH	7,1 ± 0,07	7,03 ± 0,06	7,31 ± 0,16	7,18 ± 0,09
3	Активність	62,25 ± 4,21	64,5 ± 3,83	61,91 ± 4,83	60,87 ± 5,08
	Осм. тиск	334,25 ± 1,05	333,87 ± 0,64	331,87 ± 0,79	332,62 ± 0,99
	pH	7,02 ± 0,06	7,09 ± 0,11	6,97 ± 0,10	6,99 ± 0,11
4	Активність	60,2 ± 3,59	61,8 ± 4,65	60,1 ± 3,48	60,37 ± 4,17
	Осм. тиск	327,25 ± 1,32	328,5 ± 2,19	327,25 ± 2,27	327,37 ± 0,78
	pH	7,12 ± 0,09	7,08 ± 0,03	7,14 ± 0,11	7,06 ± 0,06

У третьому досліді після розбавлення сперми у середовищі осмотичний тиск розбавленої сперми був достовірно більшим, ніж у контрольному середовищі. У другому і третьому досліді у день розбавлення середовище було достовірно менш кислим. Протягом зберігання осмотичний тиск і реакція середовища у дослідних зразках сперми незначно відрізнялися від контролю.

Таблиця 3

Амінокислота, яка додавалася в розбавник	Групи тварин	Осіменено тварин, голів	Запліднилось тварин	
			голів	%
Метіонін	К	25	19	76
	Д	25	20	80
Цистин	К	42	29	69
	Д	42	30	71,4

У результаті досліджень з'ясовано позитивний вплив додавання цистину та метіоніну до середовища для зберігання сперми кнурів «Екосперм». Так, активність спермійв у кращих дослідних варіантах середовища була на третій день зберігання на 3,61–8,74 % вищою, ніж у контрольних варіантах. Реакція середовища протягом зберігання і його осмотичний тиск мало відрізнялися між дослідним і контрольним зразками. Після цього було проведено порівняльне осіменіння свиноматок спермою, яка зберігалася у середовищі «Екосперм», і спермою з дослідними варіантами середовища, до якої додавали вказані сірковмісні сполуки в кількостях, які показали найкращі результати при зберіганні сперми кнурів в умовах лабораторії. Результати осіменіння свиноматок наведені в таблиці 3. З отриманих результатів видно, що при застосуванні всіх дослідних зразків середовищ з спермою, заплідненість свиноматок після осіменіння була вищою, проте різниці незначні.

У таблиці 4 наведені дані про ефективність застосування дослідних варіантів розбавника сперми кнурів порівняно з контролем. Результати при застосуванні контрольного розбавника («Екосперм»), взято за 100 %, а результати, отримані в дослідних варіантах, виражено у відсотках до контролю. Встановлено, що найбільшу активність мала сперма, при розбавленні її середовищем з додаванням метіоніну, далі йде середовище з додаванням цистину. На третій день зберігання сперми в обох дослідних варіантах активність спермійв була вищою, порівняно з контролем. При аналізі результативності осіменіння видно, що у

двох дослідних групах цей показник був вищим порівняно з контролем, хоч різниці і незначні. Цистин показав кращий результат, ніж метіонін.

Таблиця 4

**Показники ефективності застосування дослідних розбавників сперми кнурів порівняно з контрольним у %**

Розбавник	Активність сперми на 1-й день зберігання	Активність сперми на 3-й день зберігання	Запліднюваність свиноматок, %
Екосперм	100	100	100
Е + цистин	103,1	103,61	105,26
Е + метіонін	103,8	108,74	103,45

Отже, застосування дослідних варіантів розбавників на 3,5–5,3 % підвищує запліднюваність свиноматок порівнювано з контрольним середовищем та на 3,61–8,74 % підвищує збереженість сперми після трьохденного зберігання. Додавання метіоніну і цистину до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» має позитивний вплив на активність збереженої сперми та підвищує результативність штучного осіменіння свиноматок, внаслідок їхньої дії на стабілізацію мембран спермійв при розбавленні і зберіганні, що може бути використано при удосконаленні цього розбавника сперми кнурів.

**Висновки**

Введення у середовище для розбавлення і зберігання сперми «Екосперм» цистину і метіоніну підвищує збереження активності спермійв протягом короткотривалого (до 3 днів) зберігання сперми кнурів та відповідно на 3,61 та 8,74 % підвищує збереження спермійв після їхнього трьохденного зберігання порівняно з контролем.

Введення у середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів цистину і метіоніну підвищує на 3,45 та 5,26 % відповідно запліднюваність свиноматок.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується продовження досліджень впливу введення в середовище для розбавлення та зберігання сперми кнурів цистину і метіоніну в поєднанні з іншими органічними сполуками, які б підсилювали їх спермозберігаючу дію у середовищі.

*S. B. Kornyat*

**INFLUENCE METHIONINE AND CYSTINE ADDED TO DILUENT FOR SPERM BOAR ON STORAGE**

**S u m m a r y**

The data about the influence of administration of different doses of methionine and cystine to the medium for boar sperm dilution and storage on the activity spermatozoids during 4 days of storage, on the medium pH and its osmotic pressure are presented in the article. It has been shown that the administration of methionine and cystine to the medium enhance its action on sperm activity during short-term (to 3 days) storage and increase the spermium safety to 3.61 and 8.74 % on 3 days storage. The administration of these amino acids increase fertilization on 5.26 and 3.45 %.

*C. B. Корнят*

**ВЛИЯНИЕ МЕТИОНИНА И ЦИСТИНА, ДОДАНЫХ К СРЕДЕ ДЛЯ РОЗБАВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ НА ЕЁ СОХРАННОСТЬ.**

**А н н о т а ц и я**

Приведены данные о влиянии метионина и цистина, введенных в различных количествах в среду для разбавления и хранения спермы хряков на активность спермиев на протяжении 4-х дней хранения, реакцию среды и её осмотическое давление. Показано, что введение в среду для разбавления и хранения спермы хряков метионина и цистина улучшает её действие на сохранность активности спермиев на протяжении трёхдневного хранения спермы хряков и на 3,61 и 8,74 % увеличивает сохранность спермиев после трёхдневного хранения. Введение в среду для разбавления и хранения спермы хряков цистина и метионина увеличивало на 5,26 и 3,45 % соответственно оплодотворяемость свиноматок.

1. Інструкція із штучного осіменіння свиней. [Текст] / Відповідальний за випуск Ю. Ф. Мельник. — Київ : Аграрна наука, 2003. — 56 с.

2. *Huo L. J.* Characterization viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. [Text] / Huo L. J., Yue K. Z., Yang Z. M. // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2002. — V. 14, № 7–8. — P. 509–514.

3. *Watson P. F.* Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity : *Reprod. Domest. Anim. : Boar Semen Preservation III Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August, 1995.* / Rath D., Johnson L. A., Weitze K. F. (Etc.). — Vol. 31. — Blackwell, Berlin, 1996. — P. 135–140.

4. *De Leeuw F. E.* The role membrane damage plays in cold shock and fertility injury. [Text] / De Leeuw F. E., Colenbrander B., Vekleij A. J. // *Reprod. Domest. Anim.* — 1990. — Suppl. 1. — P. 95–104.

5. *Белоус А. М.* Структурне изменения биологических мембран при охлаждении. [Текст] / Белоус А. М., Бондаренко В. А. — Киев : Наукова думка, 1982. — 256 с.

6. *Moore H. D. M.* The binding of labeling basic proteins by boar spermatozoa. [Text] / Moore H. D. M., Hibbitt K. G. // *J. Reprod. Fertil.* — 1976. — V. 46, № 1. — P. 71–76.

7. *Ленинджер А.* Основы биохимии [Текст] : в 3-х т. / Ленинджер А. — Москва : Мир, 1985. — Т. 1. — 367 с.

8. *Johnson L. A.* Storage of boar semen. [Text] / Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P., Maxwell W. M. C. // *Animal Reproduction Science.* — 2000. — V. 62. — P. 143–172.

9. *Calvin H. I.* Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymus. [Text] / Calvin H. I., Bedford J. M. // *J. Reprod. Fertil.* — 1971. — 13 (Suppl.). — P. 65–75.

10. *Kosower N. S.* Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. [Text] / Kosower N. S., Katayose H., Yanagimachi R. // *J. Androl.* — 1992. — V. 13. — P. 342–348.

11. *Zini A.* Free thiols in human spermatozoa: correlation with sperm DNA integrity. [Text] / Zini A., Kamal K. M., Phang D. // *Urology.* — 2001. — V. 56 (1). — P. 80–84.

12. *Shalgi R.* Dynamic of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane [Text] / Shalgi R., Seligman J., Kosower N. S. // *Biol. Reprod.* — 1989. — V. 40. — P. 1037–1045.

13. *Kosower N. S.* Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei [Text] / Kosower N. S., Katayose H., Yanagimachi R. // *J. Androl.* — 1992. — V. 13. — P. 342–348.

14. *Strezek J.* Secretory activity of boar seminal vesicle glands [Text] / Strezek J. // *Reproductive Biology.* — 2002. — V. 2. — P. 243–266.

15. Довідник по годівлі сільськогосподарських тварин : [2-е вид., перероб. і доп.] / Богданов Г. О., Каравашенко В. Ф., Зверев О. І. та ін. ; За ред. Богданова Г. О. — К. : Урожай, 1986. — 488 с.

**Рецензент:** головний науковий співробітник Інституту біології тварин УААН, д. б. н., професор Янович В. Г.