УДК 636.7:577.15:57086.13:612.616

АКТИВНІСТЬ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ, ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ СПЕРМИ СОБАК НА РІЗНИХ ЕТАПАХ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

А. Р. Корбецький

Інститут біології тварин УААН

У статті наведені результати досліджень впливу технологічної обробки сперми на різних етапах кріоконсервації, а також середовищ на активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у спермі собак. Вивчено морфологічні зміни сперміів у процесі охолодження і заморожування, що разом з біохімічними дослідженнями слугувало критерієм оцінки ефективності середовищ і режимів заморожування.

Собаківництво, особливо чистопородне, набуло розвитку впродовж останніх десятиріч як в Україні, так і за її межами. У зв'язку з цим зростають вимоги до якості відтворення собак. Окрім природного спаровування набуває актуальності такий відносно новий метод відтворення собак як штучне осіменіння, який широко застосовується у світі і практично не використовується в Україні. Згаданий метод дозволяє отримувати повноцінних нащадків без безпосередньої участі кобеля, що значно розширює можливості розвитку собаківництва. При застосуванні штучного осіменіння у відтворенні собак виникає потреба консервації і довготривалому зберіганні сперми від видатних чистопородних кобелів із збереженням її запліднювальної здатності [1].

Найефективнішим методом консервації сперми є її зберігання при наднизьких температурах (–196 °С) у рідкому азоті, що широко використовується у відтворенні великої рогатої худоби [2].

Отже, виникає необхідність застосування методу кріоконсервації сперми у собаківництві, що дозволить створити кріобанк сперми різних порід і зберігати її теоретично необмежений термін, транспортувати на великі відстані, як у межах країни, так і за кордоном [3, 4, 5].

Дослідження проведені зі спермою бугаїв та баранів з кріоконсервації, вивчення впливу наднизьких температур на виживаність сперміів і плазматичних мембран після розмороження та збереження значно посприяли удосконаленню середовищ і режимів замороження сперми цих видів тварин [6, 7, 8, 9].

Існуючі середовища та режими заморожування, що застосовуються для сперми собак, частково вирішують проблему кріоконсервації, але не дають такого результативного запліднення, як при використанні свіжоодержаної або охолодженної сперми [10, 11]. У наукових роботах стосовно даного питання, автори часто застосовують заморожування сперми собак у парах азоту без використання програмних заморожувачів і спеціальних мембраностабілізуючих речовин у складі середовищ [12, 13]. Тому наші дослідження були скеровані на вивчення морфологічних, біохімічних і фізіологічних показників сперміів собак і їх зміни при низьких температурах, а також оптимізацію складу середовищ у процесі її технологічної обробки.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії фізіології і патології відтворення тварин Інституту біології тварин УААН. Для досліду використали 3 клінічно здорових безпородних кобеля віком 2–3,5 роки масою 8–25 кг. Сперму брали мануальним методом. Для роботи використовували першу та другу фракції еякуляту. Відразу після взяття сперми проводили оцінку її якості: концентрацію визначали у лічильній камері Горяєва, активність і морфологію — методом фазово-контрасної мікроскопії [14], співвідношення живих і мертвих сперміів — фарбуванням еозин-нігрозином, цілісність цитоплазматичних мембран — за допомогою тесту гіпоосмотичного набрякання сперміів (Jeyendran et al., 1984) [1]. Активність цитохромоксидази (ЦХО) визначали за методом В. І. Малюка (1965),

сукцинатдегідрогенази (СДГ) — за методом В. С. Антонюк (1978). Далі спермії відмивали у відмивному середовищі (ТРІС, глюкоза, лимонна кислота, BSA, антибіотики) у співвідношені 1:1 і центрифугували при 700 g протягом 8 хв. Надосадову рідину обережно відсмоктували піпеткою й відценриговані спермії розбавляли середовищем для кріокосервації № 1 (ТРІС, глюкоза, лимонна кислота, гліцерин, курячий жовток, антибіотики), доводячи концентрацію сперміїв до 400 млн/мл. Після періоду витримки спермії у водяній бані 15 хв, переносили в холодильник (5 °С) на 60 хв для еквілібрації. Тоді еквілібровану суспензію сперміїв розбавляли середовищем № 2 (ТРІС, глюкоза, лимонна кислота, гліцерин, курячий жовток) у співвідношені 1:1 відповідно доводячи концентрацію клітин до 200 млн/мл і наповнювали соломинки (паєти) для кріоконсервації об'ємом 0,5 мл. Заправлені соломинки заморожували за допомогою електронного програмного заморожувача Planer 204 за наступним режимом: від +5 °С до –15 °С зі швидкістю 13 °С/хв, від –15 °С до –5 °С — 25 °С/хв, від –25 °С до –100 °С — 12 °С/хв. Після закінчення програми заморожування паєти переносили в рідкий азот (–196 °С). Деконсервацію сперміїв здійснювали у водяній бані при 70 °С протягом 8 с і виливали вмісиме паєт у пробірки на водяній бані (37 °С), з яких брали зразки для подальших досліджень.

На різних етапах обробки сперми в процесі її кріоконсервації провели оцінку якості і визначення активності СДГ і ЦХО, а саме:

- у сперміях відмитих і розбавлених середовищем № 1 (до еквілібрації) — активність, морфологію, співвідношення живі/мертві, тест гіпоосмотичного набрякання сперміїв, активність СДГ і ЦХО;
- у сперміях відмитих і розбавлених середовищем № 1 (після еквілібрації) — морфологію, співвідношення живі/ мертві, тест гіпоосмотичного набрякання сперміїв, активність СДГ і ЦХО;
- після розбавлення середовищем № 2 і деконсервації — активність, морфологію, співвідношення живі/мертві, цілісність мембран, активність СДГ і ЦХО.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою статистичного пакету програм Statistica v.6.0.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень встановили високу ефективність використаних середовищ і режимів кріоконсервації, що узгоджується з даними багатьох вчених [4, 6, 10]. На фоні зниження морфологічних і біохімічних показників сперміїв собак у процесі кріоконсервації спостерігається достатньо висока її активність після розморожування (табл. 1).

Таблиця 1

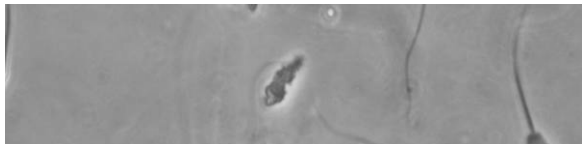
Результати проведення морфологічних і біохімічних досліджень на різних етапах кріоконсервації сперми собак (n=3)

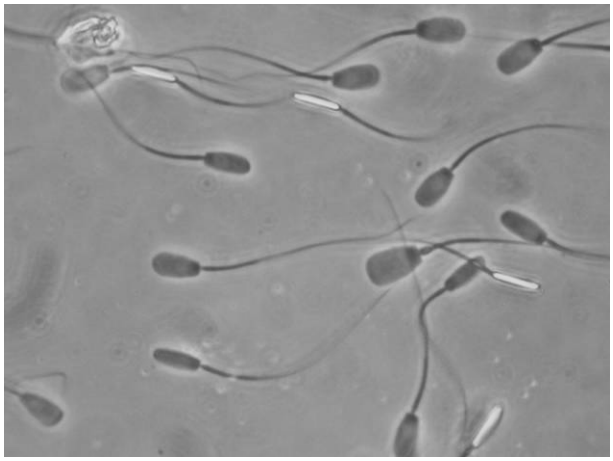
Показники	Етап дослідження сперми			
	нативна	перед еквілібрацією	після еквілібрації	після деконсервації
Активність (бали)	8,5 ± 0,5	8,0 ± 0,7	7,5 ± 1,0	6,5 ± 0,6*
Кількість патологічних клітин (%)	13 ± 1,9	15 ± 2,0	17 ± 2,4	22 ± 4,5*
Живих сперміїв (%)	82 ± 6,4	81 ± 8,1	79 ± 8,6	54 ± 10,1*
Цілісність мембран (%)	78 ± 9,3	75 ± 10,3	73 ± 12,1	47 ± 12,4*
Активність цитохромоксидази (мкМ/хв/мл)	—	38,3 ± 4,4	25,2 ± 2,2*	—
Активність сукцинатдегідрогенази (мкМ/хв/мл)	—	5,1 ± 0,45	сліди*	сліди

Примітка: * — статистично вірогідні різниці ($p<0,05$)

Так, кількість живих сперміїв після еквілібрації була майже однакова у порівнянні з нативною спермою становила відповідно 79 % і 82 %, але після деконсервації зменшилася на 34,2 % ($p<0,05$) і становила 54 %. Аналогічна картина спостерігалася і за цілісністю мембран сперміїв, показник яких після розморожування знизився на 39,8 % ($p<0,05$).

Руйнівний вплив наднизьких температур підтверджується зростанням кількості патологічних клітин (рис. 1) після еквілібрації на 30,7 % та після деконсервації на 69,2 %.





А Б

Рис. 1. Мікрофотографія сперміїв під фазово-контрастним мікроскопом до кріоконсервації (А), і після розморожування (Б)

Більш суттєво зменшилася у процесі кріоконсервації сперми активність окисних ферментів. Якщо перед еквілібрацією активність ЦХО становила 38,3 мкМ/хв/мл, то після цього технологічного етапу зменшилася на 34,3 %.

Ще суттєвіші розбіжності встановлено за активністю СДГ, де після еквілібрації та розмороження виявлено лише сліди цього фермента.

У той же час, при зниженні активності сперми після еквілібрації на 6,5 % та після деконсервації на 18,8 % ($p<0,05$), слід відзначити високу активність розмороженої сперми (6,5 бали), що цілком достатньо для результативного осіменіння собак.

Отримані результати свідчать про негативний вплив наднизьких температур на фізіологічні, морфологічні і біохімічні показники сперміїв собак у процесі їх кріоконсервації, та отримання задовільних результатів якості сперми після деконсервації. Використані методики визначення активності СДГ і ЦХО вимагають подальшої модифікації з метою їх адаптації для сперми собак.

В И С Н О В К И

1. Застосовані нами середовища і технологія кріоконсервації сперми є прийнятними для використання у практичній роботі і створенні кріобанку сперми собак, але потребують подальшого вдосконалення.

2. Процес охолодження сперміїв собак до температури –196 °С і поступова їх деконсервація (при 70 °С) до 37 °С чинить найбільш деструктивний вплив на фізіологічні, морфологічні і біохімічні показники сперміїв собак.

THE ACTIVITY OF SUCCINATEDEHYDROGENASE, CYTOCHROMEOXIDASE AND MORPHOLOGICAL INDEXES OF DOG'S SEMEN AT DIFFERENT STEPS OF CRYOPRESERVATION

A. R. Korbetskyy

S U M M A R Y

In this article are given the study results of impact of technological treatment during sperm freezing and freezing media upon activity of succinatedehydrogenase and cytochromeoxidase in dog's semen. Morphological changes of spermatozoa during cooling, freezing and thawing have been studied, together with biochemical research served as a criterion for evaluation of media and freezing rate effectiveness.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации. — Кишенев: «Штиинца», 1991. — 197 с.
2. *Chaveiro A., Machado L.* Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports // Theriogenology. — 2006 Jun. — Vol. 65 (9):18. — P. 75–90.
3. *Nothling J. O., Shuttleworth R.* The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen // Theriogenology. — 2005. — Vol. 15; 63 (5):14. — P. 69–80
4. *Hori T., Kaseki H.* Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa // J. Vet Med Sci. — 2006 Oct. — Vol. 68 (10):112. — P. 5–8.
5. *Hori T., Odaka S.* Effects of liquid nitrogen vapour sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa // J. Vet Med Sci. — 2006 Oct. — Vol. 68 (10):10. — P. 55–61.
6. *Pena F., Nunez-Martinez I.* Semen technologies in dog breeding: an update // Reprod. Domest. Anim. — 2006 Oct. — Vol. 41 Suppl. 2:2. — P. 1–9.
7. *Martins-Bessa A., Rocha A.* Comparing ethylene glycol with glycerol for cryo-preservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders // Theriogenology. — 2006 Dec. — Vol. 66 (9):20. — P. 47–55.
8. *Zindl C., Asa C. S., Gunzel-Apel A. R.* Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (Canis lupus) and Mexican gray wolves (C. l. baileyi) // Theriogenology. — 2006 Oct. — Vol. 66 (6–7):1. — P. 797–802.
9. *Silva A. R.., Cardoso R.. C., Silva L. D.* Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen // Reprod. Domest. Anim. — 2006 Feb. — Vol.41 (1):7. — P. 4–8.
10. *Rota A., Milani C., Cabianca G., Martini M.* Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation // Theriogenology. — 2006 Jun. — Vol. 65 (9):18. — P. 48–58.
11. *Cheng F. P., Wu J. T., Tsai P. S.* Effects of cryo-injury on progesterone receptor(s) of canine spermatozoa and its response to progesterone // Theriogenology. — 2005 Sep 1. — Vol. 64 (4):8. — P. 44–54.
12. *Eilts B. E.* Theoretical aspects of canine semen cryopreservation // Theriogenology. — 2005 Aug. — Vol. 64 (3):69. — P. 2–7. Review
13. *Eilts B. E.* Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation // Theriogenology. — 2005 Aug. — Vol. 64 (3):6. — P. 85–91. Review
14. *Корбецький А. Р.* Морфологічна оцінка сперми методом фазово-контрастної мікроскопії // Науково-технічний бюлетень. — 2006. — Т. 7. — № 3, 4. — С. 236–240.
15. *Rota A., Martini M., Milani C.* Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing // Reprod. Nutr. Dev. — 2005 Jan-Feb. — Vol. 45 (1). — P. 29–37.