

БІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ДЕКОНСЕРВОВАНОЇ СПЕРМИ БУГАЇВ ПРИ ІНКУБАЦІЇ З ОКРЕМИМИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ

М. М. Шаран, І. М. Яремчук

Інститут біології тварин УААН

Наведено дані щодо впливу окремих біологічно активних речовин на активність та життєздатність сперми бугаїв-плідників за умов інкубації in vitro. Встановлено, що додавання комплексу біологічно активних речовин (унітіол, інозин, естрофан, глутатіон, L-цистеїн) до деконсервованої сперми бугаїв-плідників при інкубації продовжує її активність на одну годину та абсолютний показник виживання спермійів на 2 одиниці. При цьому суттєво збільшується кількість живих спермійів та вірогідно зменшується кількість їх патологічних форм. Одержані результати досліджень дозволяють прогнозувати можливість введення комплексу БАР зі спермою для впливу на слизову оболонку матки та приживлення ембріонів у корів і телиць.

Одержання достатньої кількості морфологічно якісних ембріонів від корів-донорів значною мірою залежить від багатьох чинників: якість сперми режим штучного осіменіння, нейрогуморальні процеси регуляції овуляції [1]. Численні дослідження свідчать про прямий зв'язок кількості спермійів у дозі, їх якості з рівнем запліднення та ембріопродуктивністю [2, 3].

Одним із шляхів підвищення запліднення маточного поголів'я є введення в репродуктивні органи корів і телиць біологічно активних речовин (БАР). Введення БАР базується на тому факті, що при штучному осіменінні не тільки зменшується кількість спермійів введених у статеві шляхи самок, але і кількість плазми сперми, в якій знаходяться біологічно активні речовини. Це призводить до зниження їх впливу на репродуктивні органи самок, оскільки плазма сперми створює сприятливі умови для їх виживання в межах 1–2 діб у статевих органах [4]. Під час штучного осіменіння самок безпосередньо можна вплинути на обмінні процеси, що проходять у слизовій оболонці рогів матки за допомогою введення гормонів та інших БАР і тим самим створити сприятливі умови для розвитку ембріона на ранніх його стадіях [5, 6].

У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчити вплив біологічно активних речовин у складі розбавників сперми бугаїв на їх основні фізіологічні показники за умов інкубації.

Матеріали і методи. Дослідження проведені у Львівському науково-виробничому центрі «Західплемресурси». Об'єктом досліджень була деконсервована сперма 5 бугаїв-плідників голштинської породи в необлицьованих гранулах об'ємом 0,2 мл. Для розморожування сперми використовували 2,9 % розчин цитрату натрію, який розміщували у стерильні флакони з-під пеніциліну і підігрівали у водяній бані до температури 38 °С. З метою визначення оптимальної дози БАР, добавляли різні концентрації окремих БАР (естрофан, інозин, унітіол, глутатіон, L-цистеїн) і перевіряли активність сперми у контрольному флаконі та у флаконах з різною концентрацією БАР. Потім всі флакони ставили у термостат при температурі +38 °С і щогодинно проводили перевірку активності сперми під мікроскопом (збільшення x 200) до припинення рухливості спермійів. Таким способом перевіряли активність сперми з кожною досліджуваною біологічно активною речовиною.

Після цього вивчали вплив комплексу БАР (естрофан, інозин, унітіол, глутатіон, L-цистеїн) на активність і виживання деконсервованої сперми бугаїв за вище описаною методикою.

Крім того, вираховували абсолютний показник виживання сперми в одиницях за формулою:

$$S_a = a / 2 + \sum (a \cdot t) / n,$$

де S_a — показник абсолютного виживання сперміїв; \sum — сума; a — оцінка рухливості сперми в балах; t — час між попередньою і наступною перевіркою сперми; n — кількість проведених досліджень.

У другій серії експериментів досліджували вплив комплексу БАР на морфологічні показники деконсервованої сперми, а саме: співвідношення нормальних і патологічних форм сперміїв, відсоток живих і мертвих сперміїв які визначали за методами, описаними у довіднику за редакцією В. В. Влізла [7].

Процентне співвідношення нормальних і патологічних форм сперміїв визначали наступним чином. На знежирене і сухе предметне скло наносили невелику краплю розбавленої сперми, і робили з неї тонкий мазок. Мазок підсушували, фіксували 96° етиловим спиртом протягом 1–2 хвилини і фарбували 2 % розчином фуксину. На мазок клали смужку фільтрувального паперу, щоб залишки фарби, яка не розчинилась, не осідали на скло і не заважали підрахунку. Розчин фарби піпеткою наносили на папір і заповнювали ним всю поверхню скла. Підсохлий мазок розглядали під мікроскопом при збільшенні у 600 разів. У кожному полі зору підраховували кількість нормальних і патологічних сперміїв.

Процент живих і мертвих сперміїв визначали методом зажиттєвого фарбування, який ґрунтується на властивості живих клітин не забарвлюватися деякими мікробіологічними фарбами, тоді як мертві клітини проникні для барвників. На предметне скло ближче до кінця наносили скляною паличкою невелику краплю сперми і таку ж краплю 5 % водного розчину еозину. Краплі швидко перемішували і з суміші робили тонкий мазок на предметному склі. Надлишок суміші з краю предметного скла видаляли фільтрувальним папером. Підготовлений мазок клали на предметний столик мікроскопа і розглядали при збільшенні в 400–600 разів. У декількох полях зору підраховували підряд по 500 сперміїв незабарвлених (живих) і забарвлених в рожевий колір (мертвих). Для визначення проценту живих сперміїв користувалися формулою: $P = (Ж - 100) / 500$, де P — процент живих сперміїв, $Ж$ — кількість підрахованих незабарвлених (живих) сперміїв.

Отримані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програми Microsoft Office Excel.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень визначено оптимальні дози окремих БАР, які використали у наступних експериментах і становили: для унітіолу 1 мг на 1 мл 2,9 % розчину цитрату натрію, інозину — 0,05 мг/мл, естрофану — 0,05 мг/мл, глутатіону — 0,5 мМ, L-цистеїну — 0,5 мМ. При додаванні 5 % розчину унітіолу в дозі 1 мг на 1 мл цитрату натрію активність сперми через 2, 3 і 4 години була вищою відповідно на 11,8 %, 14,3 % і 30,0 % порівняно з контролем (табл. 1). Проте через 5 годин інкубації у термостаті при +38°C вона зрівнялась з контролем і становила 1,20 бала.

Подібну картину спостерігали з активністю контрольної і дослідної сперми при інкубації її протягом 5 годин з L-цистеїном у дозі 0,5 мМ та естрофаном дозою 12,5 мкг/мл. У першому випадку активність сперми при інкубації з L-цистеїном через 3 і 4 годин була відповідно на 22,2 % і 50,0 % вищою, ніж у контролі. Через 5 годин інкубації різниця активності сперми між дослідом і контролем збереглася на рівні 50,0 %. Додавання естрофану до сперми бугаїв майже не вплинуло на активність протягом усього періоду інкубації, яка на кінець інкубації була однаковою.

Деякі інші результати одержані при додаванні інозину в дозі 0,05 мг/мл вказаного розчину. Так, виживання сперми при додаванні інозину становило 5 годин з активністю 0,80±0,16 бала, в той час як у контролі лише 4 години з активністю 0,40±0,20 бала.

Таблиця 1

Зміна активності деконсервованої сперми при додаванні окремих БАР за інкубації 38°C, n=5

Назва БАР та доза	Кількість годин	Активність, бали	
		контроль	дослід
5% розчин	0	4,20±0,34	4,40±0,30

	1	3,80±0,10	4,20±0,22
	2	3,40±0,18	3,80±0,20
	3	2,80±0,20	3,20±0,20
	4	2,00±0,24	2,60±0,24
	5	1,20±0,20	1,20±0,22
Інозин, 0,05 мг/мл	0	4,60±0,40	4,60±0,42
	1	3,20±0,20	3,80±0,36
	2	2,20±0,20	2,40±0,40
	3	1,20±0,22	1,80±0,26
	4	0,40±0,20	1,20±0,22*
	5	—	0,80±0,16
Естрофан, 12,5 мкг/мл	0	4,20±0,30	4,20±0,32
	1	3,60±0,26	3,80±0,20
	2	3,20±0,40	3,40±0,49
	3	2,40±0,30	2,40±0,28
	4	1,40±0,50	1,20±0,39
	5	0,60±0,20	0,60±0,18
Глутатіон, 0,5 мМ	0	4,33±0,39	4,40±0,30
	1	3,60±0,35	3,40±0,40
	2	3,00±0,28	3,2±0,36
	3	2,4±0,50	2,6±0,40
	4	1,4±0,34	1,8±0,32
	5	0,60±0,18	1,2±0,12
L-цистеїн, 0,5 мМ	0	4,2±0,30	4,20±0,32
	1	3,2±0,32	3,6±0,30
	2	2,4±0,24	2,6±0,22
	3	1,8±0,20	2,2±0,24
	4	0,8±0,16	1,2±0,18
	5	0,4±0,18	0,6±0,12

Примітка: У цій і в наступних таблицях * — ступінь вірогідності різниць у показниках (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$)

Інкубування сперми бугаїв з глутатіоном теж підвищило її активність в останні години порівняно з контролем. Так, через 4 години інкубації *in vitro* активність сперми з глутатіоном була на 28,6 %, а через 5 годин удвічі вищою порівняно з контролем.

Таким чином, кожна із досліджуваних БАР проявляла позитивний вплив на активність сперми за умов інкубації, за винятком естрофану, дія якого була не так чітко виражена. Це дає підставу для вивчення дії комплексу БАР на життєздатність сперми. Враховуючи властивість простагландину $F_{2\alpha}$ викликати скорочення міометрію та забезпечувати овуляцію при введенні в матку корів, ми включили естрофан у склад комплексного препарату.

У результаті проведених досліджень встановлено, що додавання до деконсервованої сперми бугаїв-плідників комплексу біологічно активних речовин сприяє підвищенню її активності і виживанню за умов інкубації *in vitro* (табл. 2). Так, через 3 години інкубації активність гамет дослідної групи була на 30,0 % вища, через 4 год. — на 60,0 % ($p < 0,05$), через 5 годин — на 66,7 % ($p < 0,05$), а через 6 годин — вдвічі вища за контроль.

Таким чином, додавання до деконсервованої сперми БАР проявляло позитивну дію на її фізіологічні показники, і сприяло вірогідному підвищенню її активності і

життєздатності. Абсолютний показник виживання спермійв також був достовірно вищим у досліді порівняно з контролем і становив $18,6 \pm 0,60$ одиниць ($p < 0,05$).

Таблиця 2

Життєздатність деконсервованої сперми при додаванні комплексу БАР за інкубації in vitro, (M±m; n=5)

Показники	Тривалість інкубації, год.	Групи	
		контрольна	дослідна
Активність, бали	0	4,60±0,24	4,60±0,24
	1	3,80±0,30	4,20±0,24
	2	3,20±0,20	3,60±0,22
	3	2,00±0,28	2,60±0,26
	4	1,0±0,16	1,6±0,20*
	5	0,6±0,1	1,00±0,1*
	6	0,2±0,08	0,4±0,10
Абсолютний показник виживання, одиниць		16,40±0,48	18,6±0,60*

Відомо, що нативна сперма бугая придатна до використання, якщо в ній міститься не більше 18%, а у деконсервованій – 20% патологічних спермійв [8]. Тому цей показник вважають вирішальним при оцінці запліднювальної здатності сперми [9, 10, 11].

У результаті експерименту встановлено, що через годину інкубації процент патологічних спермійв у контрольній групі зріс удвічі, в той час як у дослідній групі він збільшився лише на 55,4 % і становив 10,99 % (табл. 3).

Аналогічна картина збереглася і при подальшій інкубації сперми. Так, за 3 години інкубації, процент патологічних спермійв у контролі становив 18,91 %, а в досліді 11,98 % ($p < 0,05$). На 5 годину інкубації відсоток патологічних спермійв у контролі був 23,30 %, у досліді — 14,84 % ($p < 0,01$).

Таблиця 3

Співвідношення нормальних і патологічних форм спермійв деконсервованої сперми при додаванні комплексу БАР за інкубації in vitro, (M±m, n=5)

Тривалість інкубації (год.)	Групи	Форми спермійв		% патологічних спермійв
		нормальні	патологічні	
0	контрольна	182,00±2,02	18,00±2,02	7,14±1,01
1		174,60±3,60	25,4±3,6	14,55±1,8
3		168,20±3,20	31,8±3,2	18,91±1,8
5		162,20±3,02	37,8±3,02	23,30±2,51
0	дослідна	186,80±2,40	13,2±2,40	7,07±1,51
1		180,20±2,04	19,8±2,04	10,99±1,02
3		178,60±2,60	22,4±2,60	11,98±1,40*
5		174,20±1,40	25,8±1,40	14,84±0,70**

Отже, додавання комплексу БАР до деконсервованої сперми сприяє збільшенню кількості нормальних спермійв та зменшенню їх патологічних форм.

Суттєві зміни встановлені за кількісним і процентним співвідношенням живих і мертвих спермійв при додаванні комплексу БАР за умов інкубації in vitro. Кількість живих

сперміїв на початку дослідження як у досліді так і в контролі була майже однаковою і становила 71,36 % та 71,28 %, відповідно (табл. 4).

Через годину інкубації відсоток живих сперміїв у контролі зменшився і становив 58,52 % а у досліді — 65,64 % ($p < 0,05$). Така ж тенденція зберігалася і при подальшій інкубації сперми вже через 5 годин кількість живих сперміїв у контролі становила 22,48 %, у досліді 36,92 % ($p < 0,05$).

Таблиця 4

Співвідношення живих і мертвих сперміїв деконсервованої сперми при додаванні комплексу БАР за інкубації *in vitro*, ($M \pm m$; $n=5$)

Тривалість інкубації (год.)	Групи	Спермії		% живих сперміїв
		живі, n	мертві, n	
0	контрольна	356,4±14,2	143,6±14,2	71,28±2,82
1		292,6±13,8	207,4±13,4	58,52±3,62
3		184,2±20,8	315,8±31,4	36,84±3,74
5		112,4±12,5	387,6±24,2	22,48±2,64
0	дослідна	356,8±13,8	143,2±13,0	71,36±4,22
1		328,2±12,8	172,4±22,0	65,64±2,58
3		250,4±18,6	249,6±22,4	50,08±3,46*
5		184,6±14,4	316,8±15,6	36,92±2,98**

За результатами дослідження можна зробити висновок, що застосування комплексу БАР позитивно впливає на життєздатність деконсервованої сперми і тим самим підвищує ефективність використання глибоко замороженої сперми та збереження її фізіологічних показників.

ВИСНОВКИ

1. Додавання комплексу біологічно активних речовин (унітіол, інозин, естрофан, глутатіон L-цистеїн) до деконсервованої сперми бугаїв-плідників продовжує її життєздатність на одну годину при зростанні активності майже вдвічі ($p < 0,01$). Абсолютний показник виживання сперміїв за умов інкубації *in vitro* збільшився на 2 одиниці ($p < 0,05$).

2. При *in vitro* інкубації деконсервованої сперми з комплексом БАР вірогідно збільшується кількість живих сперміїв та зменшується кількість їх патологічних форм.

3. Одержані результати досліджень дозволяють прогнозувати можливість введення комплексу БАР зі спермою бугаїв для впливу на слизову оболонку матки та приживлення ембріонів у корів і телиць.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЕКОНСЕРВИРОВАННОЙ СПЕРМЫ БЫКОВ ПРИ ИНКУБАЦИИ С ОТДЕЛЬНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Н. М. Шаран, И. М. Яремчик

АННОТАЦИЯ

Приведены данные относительно влияния отдельных биологически активных веществ на активность и жизнеспособность спермы быков-производителей при условиях инкубации *in vitro*. Установлено, что добавление комплекса биологически активных веществ (унитиол, инозин, эстрофан, глутатион, L-цистеин) к деконсервированной сперме быков-производителей при инкубации продолжает ее активность на один час и

абсолютный показатель выживания сперматозоидов на 2 единицы. При этом существенно увеличивается количество живых сперматозоидов и достоверно уменьшается количество их патологических форм. Полученные результаты исследований разрешают прогнозировать возможность введения комплекса БАР со спермой для влияния на слизистую оболочку матки и приживание эмбрионов у коров и телок.

BIOLOGICAL INDICES OF FROZEN-THAWED BULLS' SEMEN AT INCUBATION PERIOD WITH SOME BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

M. M. Sharan, I. M. Yaremchuk

SUMMARY

Data concerning impact of some biologically active compounds (BAC) upon motility and viability of bulls' semen under the conditions of incubation in-vitro are presented in the article. It was revealed, that addition of biologically active compounds (unitiol, inosin, oestrophan, glutation, L-cysteine) to frozen-thawed bull semen at incubation period prolongs its motility on one hour and its absolute index of viability by three units. At the same time the amount of pathological spermatozoa significantly decreased. Obtained experimental results allow as to predict the possibility of addition the BAC together with sperm to make positive influence on uterine mucous membrane and embryo implantation in cows and heifers.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шаловило С. Г. Розробка наукових і практичних методів підвищення ефективності трансплантації ембріонів у племінному скотарстві [Текст] : автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук : 22.05.96 / Степ. Григорович Шаловило ; [Українські технології]. — Чубинське, 1996.
2. Foote R. H. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants [Text] : /Foote R. H., Brockett C. C., Kaproth M. T. — Anim Reprod Sci. 2002 May 15;71(1-2):13-23 Department of Animal Science, 204 Morrison Hall, Cornell University, Ithaca, NY 14853-4801, USA
3. Bilodeau J. F. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen [Text] : /Bilodeau J. F., Blanchette S., Gagnon C., Sirard M. A. — Theriogenology. 2001 Jul 15;56(2):275-86. Département des Sciences Animales, Université Laval, Quebec, Canada.
4. Буров В. А. Наукові аспекти підвищення заплідненості корів. Інститут тваринництва центральних районів [Текст] / Буров В. А. // Сучасні проблеми тваринництва. — Дніпро-петровськ, 2002. — 73 с.
5. Качура В. С. Використання пенетраційного тесту в біотехнологічних дослідженнях [Текст] / Качура В. С., Служава В. В. // Вісн. с. - г. науки, — 1988. — № 8. — С 50-53.
6. Лесив М. Н. Влияние биологически активных веществ на функцию органов размножения [Текст] / Лесив М. Н., Шавкун В. Е., Скварук А. Г. // Научно-технический бюл. УНИНФиБ с. - х. животных. — 1982. — Вып. 3. — С. 65-67.
7. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології тваринництва та ветеринарній медицині. [Текст] : довідник /За редакцією Влізла В.В. — Львів, 2004. — 399 с.
8. Кругляк А. П. До ДеСТУ «Сперма бугаїв заморожена» [Текст] /Кругляк А. П., Черняк П. Г, Кругляк П. А. // Розведення і генетика тварин. — 1999. — Вип. 31/32. — С. 119.
9. Кругляк А. П. Оценка качества спермы по морфологическим показателям [Текст] : Нові методи селекції і відтворення високопродуктивних порід і типів : матер.-вир. конф. 29-30.05.96. / Кругляк А. П., Бойко Е. В. — К. : Ас «Україна», 1996. — С 375.
10. Максудов Г. Ю. Оценка качества семени животных [Текст] : Метод, рекомендации /Максудов Г. Ю., Артюшкова В. А., Трошко Е. В. // Ин-т биол физики и

др. — Пушино НЦБИ, 1987 — 42 с.

11. Соколовская И. О значении акросомы в оценке семени самцов [Текст] / Соколовская И., Гжамс Р., Абилов А. и др. // Животноводство. — 1981. — № 9. — С45–46.