

ВПЛИВ СІРКОВМІСНИХ СПОЛУК, ДОДАНИХ ДО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ РОЗБАВЛЕННЯ І ЗБЕРІГАННЯ СПЕРМИ КНУРІВ, НА ЇЇ ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ

С. Б. Корнят

Інститут біології тварин НААНУ

Наведено дані про вплив цистину, цистеїну, метіоніну і глутатіону, доданих до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на активність спермійв протягом 4 днів зберігання. Показано, що додавання до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів органічних сірковмісних сполук посилює його дію на збереження активності спермійв протягом короткотривалого (до 3 днів) зберігання сперми кнурів та на 3,61–15,17 % підвищує збереження спермійв після їхнього трьохденного зберігання. Найкращий результат отримано при використанні як добавки до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» цистеїну, що на 15,17 % покращує збереження спермійв після трьохденного її зберігання.

Перші спроби штучного осіменіння свиней були здійснені І. І. Івановим у 1926–1927 роках та продовжені В. К. Міловановим у 1930–1936 роках. Останній запропонував перші розбавники сперми (глюкозо-сульфатний і глюкозо-тарtratний) [1]. Основними сполуками, які сьогодні застосовуються виробниками в більшості середовищ для розбавлення і короткотривалого (до 3 днів) зберігання сперми кнурів у рідкому стані є:

— глюкоза — енергетичний матеріал для спермійв, який запобігає втраті ними електричного заряду, а, отже, і їхній аглютинації;

— цитрат натрію, бікарбонат натрію чи хлорид калію, які є природними буферами, зменшують проникність оболонки спермійв, послаблюють дію антитіл на спермії у статевих шляхах свиноматок та виводять з плазми сперми кальцій, вільні іони якого є шкідливими для спермійв [2];

— трилон-Б (хелатон-3 або двонатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти), котрий зв'язує дивалентні іони металів, зокрема кальцію і обмежує його проникнення через плазматичну мембрану, запобігає початку капацитації і змінам акросоми [3];

— речовини, які містять сульфгідрильні групи, котрі стабілізують мембрану спермійв при зберіганні й охолодженні та попереджують капацитацію [4];

— антиоксиданти, які продовжують тривалість життя спермійв із збереженням запліднюючої здатності [5];

— протимікробні препарати широкого спектру дії, які пригнічують в розбавленій спермі розвиток мікроорганізмів, чим продовжують термін її збереження.

Набування сперміями стійкості до холодого шоку після інкубації при кімнатній температурі рядом дослідників пояснюється адсорбцією білків плазми сперми сперміями [6]. Тому останнім часом досліджується вплив різних компонентів при додаванні їх до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на збереженість спермійв при зберіганні, і важливе місце серед цих сполук займають сірковмісні амінокислоти та білки з високим вмістом цих амінокислот або амінокислоти, які містять сульфгідрильні групи, котрі допомагають стабілізувати мембрану спермійв при зберіганні і охолодженні та попереджують капацитацію [4].

Рядом дослідників було встановлено негативну кореляцію між вмістом сульфгідрильних груп у спермі і рухливістю спермійв при значному збільшенні їхньої кількості [7]. Загальна кількість тіолів і дисульфідів сперми самців ссавців залишається

сталою протягом всього періоду дозрівання сперми, але відношення реактивних чи вільних тіолів до загальних зменшується при проходженні сперміїв від тіла до хвостової частини придатка [8]. Сульфгідрильні складники сперми кнурів, такі як глутатіон і ерготіонейн, відіграють важливу роль в захисті сперміїв кнурів від окисних пошкоджень [9].

Виходячи з вказаного, метою роботи було дослідження впливу різних сірковмісних сполук — глутатіону, цистину, цистеїну і метіоніну, доданих до середовища для розбавлення сперми кнурів, на її зберігання.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень була сперма, одержана від 10 кнурів-плідників порід ландрас, велика біла і дюрок віком 1–2-х років з ТзОВ ЛНВЦ «Західплемресурси». Кнури утримувалися безвигульно в клітках з глухими перегородками. Годівля кнурів відповідала прийнятим нормам. Сперма від кожного кнура відбиралася 7–9 разів на місяць.

Еякуляти в кнурів одержували до ранкової годівлі мануально після садки на дерев'яне чучело, розроблене в Інституті свинарства ім. О. В. Квасницького УААН. Після зважування еякулятів та визначення концентрації сперміїв у них розбавляли їх середовищем «Екосперм», до якого додавали сірковмісні сполуки (метіонін, цистин, цистеїн, глутатіон). За контроль правило середовище для розбавлення і зберігання сперми «Екосперм», а дослідними зразками було середовище, до якого додавали 100 мг досліджуваної сірковмісної сполуки на 1 л середовища. Дози сірковмісних сполук вибрані, виходячи з літературних даних, одержаних при дослідженні їх впливу на активність сперміїв протягом зберігання, та попередніх порівняльних досліджень, проведених у нашій лабораторії.

Концентрацію сперміїв в еякулятах визначали на спектрофотометрі SDM-5, а активність розбавленої та нативної сперми — на мікроскопі MBL-2000 та на мікроскопі Биолам П-1 і підігрівальному столику СН-02. Розбавлена сперма зберігалася при температурі +17–18 °С без доступу денного світла.

Результати та обговорення. З наведених у таблиці 1 даних видно, що при додаванні до середовища «Екосперм» цистеїну активність сперміїв на наступний день після розведення була вищою, порівняно з контролем на 3,2 %, на другий день — на 5,2 %, на третій — на 15,17 %, на четвертий — на 9,5 %. Найвищою, порівняно з контролем, активність сперми була на 3-й день зберігання, що узгоджується з наявними в літературі даними про позитивний вплив цистеїну гідрохлориду при додаванні його до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на виживання сперміїв та цілісність ДНК [10]. На 4-й день різниця в активності сперміїв між контрольними та дослідними зразками зменшилась до 9,54 %, що свідчить про короткотривалий вплив цистеїну, доданого до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на збереження активності сперміями при зберіганні.

Таблиця 1

Вплив цистеїну, доданого до середовища «Екосперм», на збереження активності сперміїв при розбавленні сперми кнурів (M±m, n=3)

День зберігання	Зразки розбавника	
	Контрольні	Дослідні
0	77,14±4,06	77,14±4,20
1	71,42±4,32	73,71±4,14
2	67,86±2,86	71,42±4,04
3	60,71±2,28	69,92±1,51*
4	53,33±3,33	58,42±14,59

Примітка: у цій та наступних таблицях * — статистично достовірні різниці досліджуваних показників у дослідних зразках, порівняно з контрольними: * — $P \leq 0,05$, ** — $P \leq 0,01$, *** — $P \leq 0,001$.

У таблиці 2 наведено дані про вплив метіоніну, доданого до середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» на активність спермійв протягом зберігання. З них видно, що активність спермійв у середовищі з доданим метіоніном на 1-, 2-, 3- і 4-й день зберігання була відповідно на 3,8; 4; 8,7 і 6,7 % вищою, ніж у контролі. На третій день зберігання ця різниця була статистично достовірною. Проте як і у випадку з цистеїном, вплив метіоніну на зберігання сперми до третього дня зростав, а на 4-й день активність сперми знизилася порівняно з 3 днем на 2 %. Позитивний вплив метіоніну на стійкість мембран спермійв можна пояснити тим, що він разом з цистеїном, є одним з головних попередників цистину, який відіграє ключову роль у стабілізації мембран [11].

Таблиця 2

Вплив метіоніну, доданого до середовища «Екосперм» на збереження активності спермійв при розбавленні сперми кнурів (M±m, n=3)

День зберігання	Групи	
	К	Д
0	81,25±1,25	85,0±2,24
1	78,75±1,25	81,74±1,87
2	75±2,04	78,0±1,22
3	67,5±1,04	73,4±1.83*
4	63,75±2,39	68,0±1,58

У таблиці 3 наведено дані про вплив різних доз цистину, доданого до середовища «Екосперм», на активність сперми протягом 4 днів зберігання. З наведених даних видно, що активність сперми в дослідних зразках після зберігання на 1-, 2-, 3- і 4-й день була відповідно на 3,1, 2,1, 3,6 і 2,7 % вища, ніж у контролі. Менші різниці між контрольним і дослідним зразками за впливу цистину, ніж за впливу цистеїну і метіоніну можна пояснити тим, що цистин є менш метаболічно активною сполукою, ніж вказані сполуки.

Таблиця 3

Вплив цистину, доданого до середовища «Екосперм» на збереження активності спермійв при розбавленні сперми кнурів (M±m, n=3)

День зберігання	Групи	
	К	Д
0	70±2,31	71,8±2,24
1	65,0±5,74	67,0±5,58
2	64,12±3,77	65,5±3,11
3	62,25±4,21	64,5±3,83
4	60,2±3,59	61,8±4,65

З наведених у таблиці 4 даних видно, що при додаванні глутатіону в середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів активність спермійв у дослідних зразках збереженої сперми була вищою на 1,5, 5,0 і 4,5 %, ніж активність контрольної сперми на 2-, 3- і 4-й дні зберігання відповідно.

Таблиця 4

Вплив глутатіону, доданого до середовища «Екосперм», на збереження активності спермійв при розбавленні сперми кнурів (M±m, n=3)

День зберігання	Групи	
	К	Д
0	75±2,88	75±2,37
1	70,0±5,77	70,0±4,18
2	65,0±4,4	66,0±2,24
3	2	3
3	56,04±3,85	58,82±4,46
4	48,61±2,75	50,79±4,15

При дослідженні сперми бугаїв було встановлено, що після еякуляції вміст глутатіону у спермі різко знижується, порівняно з рівнем у сперміях чи плазмі сперми, які знаходилися у придатках сім'яників і сім'яниках [12]. Відомо, що глутатіон відіграє важливу роль в захисті сперміїв кнурів від окисних пошкоджень [13], чим і можна пояснити позитивний вплив додавання вказаної сполуки до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів на збереження сперміїв.

З наведених у таблицях даних видно, що найбільшу активність на третій день зберігання порівняно з контролем, мала сперма, при розбавленні її середовищем, до якого додавали цистеїн, далі йдуть в порядку зменшення середовища, до яких додавали метіонін, глутатіон і цистин. На третій день зберігання сперми в усіх дослідних групах активність сперміїв була найвищою, порівняно з контролем.

В И С Н О В К И

Додавання до середовища для розбавлення і зберігання сперми «Екосперм» цистеїну, метіоніну, цистину і глутатіону підвищує його дію на збереження активності сперміїв протягом короткотривалого (до 3 днів) зберігання сперми кнурів, а також підвищує збереження сперміїв після трьохденного зберігання. На третій день зберігання сперми кнурів при додаванні в середовище «Екосперм» цистеїну, метіоніну, цистину і глутатіону активність сперміїв була вищою відповідно на 15,17, 8,74, 3,61 та 4,96 %.

Найкращий результат отримано при використанні як добавки до середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм» цистеїну, що на 15,17 % покращує збереження сперміїв.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження дозволять розробити стратегію покращення середовищ для розбавлення і зберігання сперми кнурів.

INFLUENCE OF SULFURCONTAINS COMPONENTS ADDED TO DILUENT FOR SPERM BOAR ON STORAGE

S. B. Kornyat

S U M M A R Y

The data about the influence of addition of cystine, cysteine, methionine and glutathione to the environment for boar sperm dilution and storage on the activity of spermatozoids during 4 days of storage are presented in the article. It was shown that the addition of its components to the environment enhance its action on sperm activity during short-term (up to 3 days) storage and increase the spermium safety to 3,61 and 15,17% on 3 days storage.

ВЛИЯНИЕ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ, ДОБАВЛЯЕМЫХ К СРЕДЕ ДЛЯ РАЗБАВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ НА ЕЁ СОХРАННОСТЬ

С. Б. Корнят

А Н Н О Т А Ц И Я

Приведены данные о влиянии цистина, цистеина, метионина и глутатиона, добавленных в среду для разбавления и хранения спермы хряков на активность спермиев на протяжении хранения. Показано, что добавление к среде для разбавления и хранения спермы хряков органических серосодержащих соединений усиливает его действие на сохранение активности спермиев на протяжении кратковременного (до 3 дней) хранения

спермы хряков и на 3,61–15,17 % увеличивает сохранность спермиев после их трёхдневного хранения. Самый лучший результат получен при использовании как добавки к среде для разбавления спермы хряков «Екосперм» цистеина, что на 15,17 % улучшает сохранность спермиев после трёхдневного её хранения.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Милованов В. К.* Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных / В. К. Милованов. — Москва : Издательство сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов, 1962. — 696 с.
2. *Gadella B. M.* The capacitation agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent change in phospholipids transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane / B. M. Gadella, R. A. P. Harrison // *Development*. — 2000. — V. 127. — P. 2407–2420.
3. *Watson P. F.* Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G. (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction* 4th edn. — V. 2. — Churchill Livingstone, Edinburgh, 1990, — P. 747–869.
4. *Johnson L. A.* Storage of boar semen / L. A. Johnson, K. F. Weitze, P. Fiser, W. M. C. Maxwell // *Animal Reproduction Science*. — 2000. — V. 62. — P. 143–172.
5. *Funahashi H.* Select antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degrees / H. Funahashi, T. Sano // *Theriogenology*. — 2005. — V. 63 (6). — P. 1605–1616.
6. *Moore H. D. M.* The binding of labeling basic proteins by boar spermatozoa / H. D. M. Moore, K. G. Hibbitt // *J. Reprod. Fertil.* — 1976. — V. 46(1). — P. 71–76.
7. *Zini A.* Free thiols in human spermatozoa: correlation with sperm DNA integrity / A. Zini, K. M. Kamal, D. Phang // *Urology*. — 2001. — V. 56 (1). — P. 80–84.
8. *Shalgi R.* Dynamic of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane / R. Shalgi, J. Seligman, N. S. Kosower // *Biol. Reprod.* — 1989. — V. 40. — P. 1037–1045.
9. *Strezek J.* Secretory activity of boar seminal vesicle glands / J. Strezek // *Reproductive Biology*. — 2002. — V. 2. — P. 243–266.
10. *Szczesniak-Fabianczyk B.* Effect of antioxidant added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure / B. Szczesniak-Fabianczyk, M. Bochenek, Z. Smorag, F. Ryszka // *Reproductive Biology*. — 2003. — V. 3(1). — P. 81–87.
11. *Ленинджер А.* Основы биохимии / А. Ленинджер // В 3-х томах, т. 1. — Москва : Мир. — 1985. — 367 с.
12. *Agrawal Y. P.* Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues / Y. P. Agrawal, T. Vanha-Pertula // *International Journal of Andrology*. — 1988. — V. 11. — P. 123–131.
13. *Strezek J.* Secretory activity of boar seminal vesicle glands / J. Strezek // *Reproductive Biology*. — 2002. — V. 2. — P. 243–266.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.