

ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНА МІГРАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ У ПРОЦЕСІ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМІЇВ КНУРА ЯК ПОКАЗНИК КРІОУШКОДЖЕННЯ ЇХ МОРФОЛОГІЧНИХ СТРУКТУР

О. О. Миколай*^{*}

Інститут біології тварин НААН

У статті наведено результати вивчення активності лактатдегідрогенази і аспартатамінотрансферази у середовищі в процесі технологічної підготовки до кріоконсервування сперми. Встановлено, що між переміщенням ферментів ЛДГ і АсАТ із спермій і активністю, виживаністю і тестом гіпоосмотичного набрякання спермій існує сильний негативний кореляційний зв'язок ($r=-0,52-0,95$) тільки на етапах еквілібрації і розморожування, а з цілісністю акросом — слабкий на всіх етапах ($r=+0,32-0,52$).

Відомо, що сперма кнура володіє зниженою стійкістю до кріоконсервування. Це негативно впливає на виживання спермій після розморожування і їх запліднюючу здатність [1–3]. Для удосконалення методу глибокого заморожування сперми кнурів необхідно вияснити причини і механізми пошкодження клітин у процесі їх глибокого заморожування. Низькі температури викликають численні біологічні зміни в клітині. При заморожуванні і розморожуванні сперми в ній відбуваються фізіологічні і біохімічні зміни, які зумовлені різними факторами кріоушкодження. Охолодження сприяє переходу акросомальних ферментів у середовище, що оточує спермії [2–5]. Встановлено, що після заморожування сперми посилюється частковий витік внутрішньоклітинних ферментів, зростання активності у середовищі і зниження активності у сперміях [6, 8]. Так відомо, що витік акросомальних ферментів акрозину і гіалуронідази при заморожуванні і деконсервуванні сперми корелюють із запліднюваністю [9, 10].

Глибоке замороження сперми кнурів сприяє витоку аспартатамінотрансферази (АсАТ) і лактатдегідрогенази (ЛДГ) із спермій у плазму. Технологічна обробка сперми (розбавлення із середовищем) викликає втрату АсАТ [11, 12]. Спостерігається висока кореляція вмісту АсАТ у свіжооодержаній і розмороженій спермі із заплідненістю свиноматок.

Це послужило основою використання ступеня переходу АсАТ із спермій як тесту пошкодження мембрани при технологічних обробках.

Також було встановлено, що відсоток ізоферментів ЛДГ і ступінь їх переходу із спермій кнура в плазму змінюється залежно від добавленого кріопротектора [12, 14]. Ступінь переходу ЛДГ із статевих клітин кнура негативно корелює із запліднюючою здатністю деконсервованих спермій.

Мета досліджень — вивчити активність ЛДГ і АсАТ у середовищі для кріоконсервації в процесі технологічної підготовки до кріоконсервування та розморожування сперми.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії фізіології і патології відтворення тварин. Сперму для досліджень отримували мануальним методом від чотирьох кнурів породи ландрас віком 2–4 роки у ЛНВЦ «Західплемресурси». Заморожування сперми здійснювали в соломинках 0,5 мл (IMV, Франція) на програмному заморожувачі Planer R204 (Великобританія). Еквілібрацію проводили при 5 °С протягом 120 хв. Розморожували проби при 37 °С впродовж 30 с. Досліджували плазму сперми на етапах розбавлення середовищем, еквілібрації і розморожування. Активність спермій визначали мікроскопічно з використанням методу фазового контрасту на мікроскопі МБИ-15-2 (ЛОМО, СРСР) при збільшенні 400 раз і температурою 37 °С, та виражали у відсотках спермії з прямолінійним поступальним рухом від загальної кількості.

Вживання спермій визначали при температурі 37 °С під мікроскопом. Кожних 30 хв. оцінювали загальну рухливість спермій і підраховували час до повного припинення руху. Тест гіпоосмотичного набрякання спермій (ТГОНС) проводили за методикою [15]. Досліджували при фазовому контрасті і загальному збільшенні 400х. Підраховували 200 спермій відповідно ділячи їх на дві групи: спермії з закрученими хвостами і спермії з рівними хвостами, виражаючи першу у відсотках. Цілісність акросом спермій визначали методом фазово-контрастної мікроскопії при збільшенні 400х. Для розрахунку брали не менше 200 спермій в кількох полях зору, серед яких виділяли спермії з відшарованими або повністю зруйнованими акросомами та спермії з неушкодженими акросомами, які виражали у відсотках. Активність ЛДГ у плазмі та середовищі визначали за допомогою набору реактивів Liquick Cog-LDH® (PZ Cormay S. A., Польща) згідно з інструкцією виробника. Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-26 в кюветах з кварцового скла, при довжині хвилі 340 нм і виражали у міжнародних одиницях (м.о.). Активність АсАТ у плазмі та середовищі визначали за допомогою набору для визначення аспартатамінотрансферази за методом Райтмана - Френкеля. Вимірювання проводили в кюветах з кварцового скла, при довжині хвилі 515 нм і виражали у м.о. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету програм Statistica 7 (StatSoft, США).

Результати та обговорення. Встановлено, що показники, які отримали після розбавлення сперми середовищем, вірогідно не відрізняються від нативної сперми. Це свідчить про те, що еякулят розріджений розбавником при кімнатній температурі покращує показники виживаності, що пояснюється присутністю в середовищі енергетичних компонентів і буферністю середовища.

Зміни, які відбулися після охолодження сперми до 5 °С протягом 2 год, показали вірогідне зниження всіх досліджуваних показників (табл. 1).

Таблиця 1

Мікроскопічні і біохімічні показники на різних етапах кріоконсервації спермій кнур; n=8, p<0,05

Показники	Технологічний етап кріоконсервування сперми		
	після розбавлення	після еквілібрації	після розморожування
Активність, %	85,8 ± 15,0	70,8 ± 10,0	40,1 ± 15,2
Вживання, год	34,6 ± 11,0	25,5 ± 12,3	6,9 ± 2,2
ТГОНС, %	88,3 ± 12,1	74,5 ± 12,2	44,2 ± 18,1
Цілісність акросом, %	74,4 ± 18,1	62,3 ± 24,01	36,3 ± 20,1
ЛДГ, м.о.	2,4 ± 1,4	27,4 ± 1,2	63,1 ± 19,0
АСТ, м.о.	3,6 ± 2,9	38,6 ± 2,3	54,6 ± 14,6

Як впливає з наших результатів, ушкодження гамет починається як в період охолодження так і після розморожування, що підтверджується результатами дослідників, які займались вивченням цих питань [12, 14].

Так, після еквілібрації активність спермій знизилась на 15,0 % порівняно з розбавленою спермою, а після розморожування на 45,7 %. Вживаність спермій у процесі технологічної обробки знижувалась від етапу розбавлення до еквілібрації на 26,3 %, а від еквілібрації до розморожування на 72,9 %. Цілісність цитоплазматичних мембран, що оцінюється за допомогою ТГОНС, знижується від розбавлення до еквілібрації і від еквілібрації до розморожування, відповідно, на 13,8 % і 30,3 %. Аналогічно кількість спермій із неушкодженою акросомою зменшувалась у процесі технологічної обробки і найбільше ушкодження було на етапі від еквілібрації до розморожування — різниця становила 26,0 %.

Аналізуючи результати біохімічних досліджень ферментів, які витікають з клітин у процесі їх кріоушкодження, встановлено, що після розбавлення сперми синтетичним середовищем активність ферментів ЛДГ і АсАТ у середовищі мінімальна (2,4 і 3,6 м.о.). Охолодження сперми під час еквілібрації призводить до значного зростання активності ферментів у середовищі на 25 м.о. і 35 м.о., відповідно. Тенденція до зростання

активності ферментів в середовищі після розморожування зберігається і досягає найвищого рівня (63 м.о. і 54,6 м.о), ніж було до заморожування.

Між показниками якості сперми і зростанням ферментів в синтетичному середовищі існує негативна кореляційна залежність. Як видно із таблиці 2, на стадії розбавлення середовищем між ними існує слабкий і середній негативний зв'язок ($r=-0,17-0,46$). Це пов'язано з тим, що спермії після розбавлення не зазнають значних ушкоджень.

Таблиця 2

Коефіцієнти кореляції між мікроскопічними та біохімічними показниками на різних етапах кріоконсервації спермійв кнурів; $n=8$, $p<0,05$

Показники	Після розбавлення		Після еквілібрації		Після розморожування	
	ЛДГ	АсАт	ЛДГ	АсАт	ЛДГ	АсАт
Активність, %	- 0,23	- 0,24	- 0,62	- 0,52	- 0,72	- 0,61
Виживання, год	-0,33	-0,17	-0,58	-0,71	- 0,94	- 0,90
ТГОНС, %	- 0,35	- 0,46	- 0,88	- 0,92	- 0,89	- 0,95
Цілісність акросом, %	0,32	- 0,40	0,47	- 0,50	0,46	- 0,52

На етапах еквілібрації і розмороження існує сильний негативний зв'язок між витоком з цитоплазми ферментів і активністю спермійв ($r= - 0,52-0,62$), виживанням ($r= -0,58-0,94$) і цілісністю цитоплазматичних мембран ($r= -0,88-0,95$). Між цілісністю акросом і активністю ферментів існує середньої сили кореляційна залежність ($r= 0,46-0,52$), оскільки акросома не містить ферментів, які є предметом даного дослідження.

ВИСНОВКИ

1. Ушкодження цитоплазматичних і акросомальних мембран, а також зростання активності ферментів ЛДГ і АсАТ у позаклітинному середовищі виникають ще при охолодженні клітин до $+5^{\circ}\text{C}$, а при заморожуванні до -196°C значно посилюються.

2. Між міграцією ферментів ЛДГ і АсАТ із спермійв та активністю, виживаністю і ТГОНС існує тісна негативна кореляційна залежність на етапах після еквілібрації і заморожування, а з цілісністю акросом слабка кореляція на всіх етапах заморожування.

Перспективи подальших досліджень. Перспективними будуть експерименти з вивчення взаємозв'язку між запліднюваністю свиноматок і ферментами деконсервованої сперми кнурів, у якій попередньо визначено активність ферментів АсАТ і ЛДГ.

EXTRACELLULAR ENZYMES MIGRATION IN THE PROCESS OF THE BOAR SPERM CRYOPRESERVATION AS AN INDICATOR OF CRYOINJURY OF THEIR MORPHOLOGICAL STRUCTURES

O. O. Mykolaiv

S U M M A R Y

In this article are given the study results of enzyme activity of lactatedehydrogenase and aspartateaminotransferase in the media in the process technological preparation for sperm cryopreservation. It was established that between leaking of enzymes LDH and AcAt out of spermatozoa and activity, survival and HOST there is a strong negative correlation ($r = -0,52-0,95$) only on stages after equilibration and thawing, and with acrosome integrity is weak at all stages ($r = +0,32-0,52$).

ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНАЯ МИГРАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМИЕВ ХРЯКА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КРИОРАЗРУШЕНИЙ ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

АННОТАЦИЯ

В статье приведены результаты изучения активности лактатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы в среде окружающей спермии в процессе технологической обработки при криоконсервации спермы. Установлено, что между перемещением ферментов ЛДГ и АсАТ из спермиев и активностью, выживаемостью и тестом гипоосмотическим набуханием спермиев существует сильная отрицательная корреляционная связь ($r = -0,52-0,95$) только на этапах эквilibрации и размораживания, а с целостностью акросом — слабый на всех этапах ($r = +0,32-0,52$).

ЛІТЕРАТУРА

1. Ескин Г. В. Использование антиоксидантов при глубоком замораживании сперми хряков / Г. В. Ескин., И. Г. Коба., А. Г. Нарижный. // Сборник научных трудов БГСХА. — 2005. — вып. 4. — С. 22–24.
2. Ескин Г. В. Теория и практика искусственного осеменения свиней свежевзятой и замороженной спермой / Г. В. Ескин, А. Г. Нарижный., Г. С. Походня // Монография — Белгород : Везелица, 2007. — 253 с.
3. Наук В. А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервации / В. А. Наук // Кишинев, 1991. — 198 с.
4. Пушкарь К. Введение в криобиологию / К. Пушкарь., А. Белоус // Киев. — 1975. — 342 с.
7. Антонюк В. Биохимический контроль за качеством спермы / В. Антонюк // Доклады ВАСХНИЛ. 1980. — № 1. — С. 27–30.
8. Антонюк В. С. Взаимосвязь физиологических функций и биохимических свойств спермы хряков / В. С. Антонюк // Автореф. дис. д-ра биол. наук. — Харьков, 1984. — 49 с.
9. Бабушкин П. Оплодотворяющая способность свежего и замороженного эякулятов хряков / П. Бабушкин, П. Маерчяк, М. Томанек // Симпозиум по теме: Криоконсервация семени барана и хряка — 14–15.X.82 г. Варна, София, 1984. — С. 94–96.
10. Милованов В. К. Окислительно-восстановительный режим при хранении сперматозоидов сельскохозяйственных животных вне организма / В. К. Милованов // Труды ЛЮО, ВИЖ. — 1940. — Т. I. — С. 180–207.
11. Чернічко О. М. Формування продуктивних якостей у свиней різних екстер'єрних типів в процесі онтогенезу: Дис. канд. с.-г. наук: 6.02.01 / О. М. Чернічко // Інститут агроєкології та біотехнології УААН. — К., 2001. — 135 с.
12. Нарижный А. Г. Влияние новых антиоксидантов на криоустойчивость спермы хряков / А. Г. Нарижный., О. Н. Русецкая., А. Ч. Джамалдинов и др. // Сборник научных трудов международной конференции ВНИИПФиТ. — 2000. — С. 187–188.
13. Pursel V. G. Procedure for preservation of boar spermatozoa by freezing-bull // V. G. Pursel, L. A. Johnson // Arg. Rec. Ser.-Dept. Arg. ARS. — 1971.— 24. — P. 224–231.
14. Eriksson B. M. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat-Packs and Maxi-straws. h i m . / B. M. Eriksson and Rodriguez-Martinez // Reprod. Sci. — 2000. — 63 : P. 205–220.
15. Lechniak D, The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro / D. Lechniak, A. Kedzierski, D. Stanislawski // Reproduction in Domestic Animals. — 2002. — P. 379–380.

Рецензент: доктор сільськогосподарських наук Остапів Д. Д.