

# АНАТОМІЯ, ФІЗІОЛОГІЯ ТА МОРФОЛОГІЯ

УДК: 636.2:591.3.57.085

## КОНЦЕНТРАЦІЯ ФРУКТОЗИ В СПЕРМІЯХ ТА ПЛАЗМИ СПЕРМИ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ В СКЛАД СЕРЕДОВИЩА АНТИОКСИДАНТІВ

**М.Д. Камбур**, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

**А.А. Замазій**, д.вет.н., професор, Полтавська ДАА

**В.Ю. Кассіч**, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

**Г.І. Ребенко**, к.вет.н., доцент, Сумський національний аграрний університет

*Результати досліджень наведені у статті свідчать, що введення в склад середовища антиоксидантів та селену позитивно впливає на збереження рухливості спермій. Встановлено, що після розморожування спермій їх живучість збільшилась вірогідно ( $p < 0,01$ ). Концентрація фруктози за умов додавання у середовище антиоксидантів та селену в сперміях і плазмі сперми вірогідно зменшується, що свідчить про зниження використання ними енергії.*

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** Одним із способів пристосування деяких видів тварин та мікроорганізмів до несприятливих умов зовнішнього середовища є перехід у стан гіпобіозу. Стан зниженої життєдіяльності організму супроводжується суттєвими змінами метаболічних процесів у тканинах. Встановлено, що окислення органічних речовин у клітині за умов гіпобіозу відбувається майже без участі кисню. У цьому разі гальмується утворення та виділення води з організму. Тому вивчення біохімічних механізмів розвитку гіпобіозу у різних видів живих організмів є актуальним.

Однією з проблем ветеринарної медицини є продовження терміну зберігання сперми поза організмом. Слід зазначити, що сперматозоїдам притаманні ряд особливостей. Так, сперматозоїди, які знаходяться в придатку сім'яника тварин перебувають у стані зниженої активності. В активний стан вони переходять тільки після еякуляції, тобто після змішування їх із секретами придаткових залоз. Це явище має пристосувальний характер, оскільки сперматозоїди, на відміну від інших клітин, не здатні накопичувати значні кількості органічних речовин. Крім того, сперматозоїди тварин здатні до активного руху. Інтенсивність їх руху є одним з головних факторів, що забезпечує запліднення яйцеклітини. Головне місце в забезпеченні енергії для руху належить анаеробному та аеробному розщепленню вуглеводів. Слід зазначити, що ці процеси, в основному, залежать від доступності позаклітинних субстратів. Зниження їх кількості в середовищі, де зберігається сперма, супроводжується зменшенням активності та загибеллю сперматозоїдів [1, 2].

**Зв'язок з важливим науковим і практичним завданням.** Проведені дослідження були складовою частиною тематичного плану «Розробка мультипараметричної системи виробництва молока на основі секретотворюючої функції молочної залози, пре- та постнатального розвитку тваринного організму і методів їх корекції» № державної реєстрації 018U010281 (Розділ 2. «Фізіолого-біохімічні параметри пре- та постнаталь-

ного розвитку тварин та їх корекція» (2006-2011 рр.), а також теми «Розробити систему оцінки функціонального стану молочної залози та методи профілактики її порушень у корів в різні періоди лактації» № державної реєстрації 0106U009414 (2005-2006 рр.)

**Аналіз літературних даних, в яких започатковано розв'язання проблеми.** Одними з перших досліджень напрямку збереження сперми поза організмом були роботи І.І. Іванова, проведені ще на початку 20 століття. Спеціальні поживні середовища дають змогу використовувати сперму для осіменіння тварин протягом декількох діб, що має велике практичне значення для тваринництва та ветеринарної медицини. Удосконалення поживних середовищ триває і нині [3, 4].

Спосіб глибокого заморожування сперми суттєво продовжує термін її зберігання (десятки років). Проте близько 50 % сперматозоїдів гине під час заморожування та розморожування. Тому, пошук способів підвищення життєдіяльності сперматозоїдів при глибокому її заморожуванні залишається актуальним і по нині.

З удосконаленням способів короткострокового зберігання сперми було встановлено, що переведення сперматозоїдів у стан гіпобіозу з використанням явища зниження температури ( $+2...+4^{\circ}\text{C}$ ) значно продовжує їх життєдіяльність. Другим способом переведення сперматозоїдів у цей стан життєдіяльності є вуглекислотний гіпобіоз. Розробка цього методу зберігання сперми проводилась проф. І.В. Смірновим та його учнями в 60-х роках 20 століття. Ними було встановлено, що насичення середовища для зберігання сперми вуглекислим газом переводило сперматозоїди в стан зниженої життєдіяльності. Це дало можливість продовжити термін зберігання розбавленої сперми на 48 годин. Але цей спосіб не знайшов широкого практичного застосування, бо насичення середовища вуглекислим газом обумовлює різке його закислення ( $\text{pH } 5,0$  і нижче), що викликало, через вказаний час, масову загибель статевих клітин.

Встановлено, що змінюючи концентрацію та

співвідношення  $\text{HCO}_3$  та  $\text{p CO}_2$  у поживному середовищі можна попереджувати розвиток респіраторного ацидозу, а також впливати як на характер обміну речовин у сперматозоїдах, так і на їх запліднювальну здатність [5, 6].

Відомо, що при природному заплідненні домашніх тварин в статеві шляхи самок потрапляє величезна кількість живчиків (мільярди у жуйних, десятки мільярдів у свиней). Разом з тим в численних експериментах доведено, що в яйцепроводі до місця запліднення проникає лише незначна їх частка: від 0,001% до 0,0001%, або по 10-20 тис. Живчиків в кожен яйцепровід. При штучному заплідненні, незважаючи на 100-кратне зменшення числа живчиків, що вводяться в статеві шляхи, їх чисельність у яйцепроводах також складає по 10-20 тис. у кожному [7 - 11].

**Мета досліджень.** Вивчити вплив антиоксидантів у складі середовища на показники енергетичних процесів у сперматозоїдах бугаїв та в плазмі сперми.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження були проведені у лабораторії ВАТ «Черкаси Сервіс». Для дослідження використовували сперму бугаїв голштино - фризької породи.

Сперму отримували згідно з графіком роботи підприємства (одна дуплетна садка протягом трьох днів) за допомогою штучної вагіни. Після отримання сперми проводили оцінку рухливості спермій. У досліді використовували сперму, яка відповідала вимогам і відповідній інструкції.

Для вирішення поставлених перед нами задач було заплановано проведення двох серій досліджень.

У першій серії дослідів нами визначалися особливості енергетичних процесів сперматозоїдів, що розбавлялися середовищами з вмістом антиоксидантів (жиророзчинних вітамінів та селену): концентрацію ряду метаболітів фруктолізу.

У сперматозоїдах та плазмі визначали:

- концентрацію фруктози (Меланов В.К., 1962)
- концентрацію молочної кислоти та піровиноградної (Hoborst N., 1959 р).

Для проведення даної серії досліджень еякулят поділили на дві частини – контроль та дослід.

Контрольні зразки сперми розводили у співвідношенні 1:1 одинвідсотковим розчином  $\text{NaCl}$ , а дослідні зразки сумішшю розчину  $\text{NaCl}$  та антиоксидантів.

Контрольні дослідні зразки нами зберігалися у герметично закритому посуді при температурі  $+12 - +13^\circ\text{C}$ . Відбір проб проводили безпосередньо, а потім через 1, 2, 3, 4, 12 та 24 години після їх підготовки (об'єм зразків 1 мл).

Після зберігання, з метою відокремлення сперматозоїдів від компонентів розчинника та плазми проби центрифугували двічі протягом 15 хв, при 5000 оборотів за хвилину. Клітини ресуспензували одинвідсотковим розчином  $\text{NaCl}$ , доводячи об'єм кожного зразка до 1 мл.

У другій серії досліджень нами визначався стан сперми після зберігання у середовищах з антиоксидантом. Під час досліджень контрольні проби спермій розбавляли стандартним глюкозо – цитратно - жовтковим середовищем (ГЦЖ).

Дослідні проби спермій розбавляли ГЦЖ - середовищем, до складу якого вносили антиоксиданти (жиророзчинні вітаміни D, E та селен). У перше дослідне середовище додатково вводили по 5 мл. жиророзчинного вітаміну А, друге – вітамін Е, третє – вітаміни Е і А та селен (хімічно чистий) і з розрахунку 0,2 г на 1000 мл середовища.

Обробку результатів досліджень проводили з використанням комп'ютерної техніки та таблиць Стюдента.

**Результати власних досліджень.** Характерною рисою спермій ссавців є їх рухливість, яка має важливе значення у процесі запліднення.

Результати даних, щодо живучості сперми, наведених в таблиці 1 свідчать, що після розведення, живучість спермій як в контролі, так і дослідних зразках знаходилася в межах від  $5,3 \pm 0,14$  до  $5,4 \pm 0,08$  годин.

Після розморожування сперми даний показник контролю дещо знизився, а в дослідних групах залишився майже на тому рівні.

Таблиця 1.

Фізіологічні показники гамет

| Показники                                           | Групи           |                     |                 |                      |
|-----------------------------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|----------------------|
|                                                     | Контроль        | I                   | II              | III                  |
| Рухомість гамет                                     | $3,8 \pm 0,07$  | $3,9 \pm 0,09$      | $3,8 \pm 0,08$  | $4,0 \pm 0,03$       |
|                                                     | $3,6 \pm 0,23$  | $3,9 \pm 0,15$      | $4,0 \pm 0,09$  | $4,1 \pm 0,12$       |
| Виживання при $37^\circ\text{C}$ (час)              | $5,4 \pm 0,08$  | $5,3 \pm 0,17$      | $5,3 \pm 0,15$  | $5,3 \pm 0,14$       |
|                                                     | $5,6 \pm 0,28$  | $6,5 \pm 0,28^{**}$ | $6,1 \pm 0,16$  | $6,9 \pm 0,17^{***}$ |
| Абсолютний показник живучоті при $37^\circ\text{C}$ | $12,0 \pm 1,36$ | $12,1 \pm 0,49$     | $13,0 \pm 0,89$ | $13,7 \pm 0,68$      |
|                                                     | $12,1 \pm 0,46$ | $13,8 \pm 0,60$     | $12,6 \pm 0,66$ | $14,9 \pm 0,37^{**}$ |

Примітка: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Під час дослідження рухомості гамет було встановлено, що даний показник як у контрольних групах, так і в дослідних майже не відрізнявся. Після розведення проб сперми рухомість гамет контролю складала від  $3,4 \pm 0,08$  до  $4,0 \pm 0,03$ .

Після розморожування сперми в першій контрольній групі даний показник достовірно збільшився до  $6,5 \pm 0,28$  ( $p > 0,01$ ). Також позитивна динаміка щодо збереженості сперми спостерігається в третій дослідній групі, в якій даний показник

становив  $6,9 \pm 0,17$  ( $p > 0,01$ ) годин.

Абсолютний показник живучості, на початок дослідження в контрольних та дослідних зразках коливався в межах від  $12,0 \pm 1,36$  до  $13,7 \pm 0,68$  годин. Після розморожування спостерігається підвищення живучості спермій у 1,14 рази в I групі ( $p > 0,01$ ) та у 1,04 рази в II групі. В дослідних зразках, які розбавляли середовищем з антиоксидантами та селеном абсолютний показник живучості спермій збільшився до  $14,9 \pm 0,37$  годин ( $p > 0,01$ ), що у 1,23 рази більше, ніж в контролі.

Таким чином, після дослідження фізіологічних показників гамет було встановлено, що додавання до середовища антиоксидантів позитивно впливає на виживання та підвищує абсолютну живучість спермій.

Джерелом енергії для руху спермій є цукри, оскільки вони легко проникають крізь оболонку й піддаються розщепленню з виділенням енергії. Головним цукром спермій є фруктоза.

Нами була вивчена динаміка концентрації фруктози за умов введення до складу середовища антиоксидантів. Встановлено, що концентрація фруктози в нативній спермі майже не відрізнялася в залежності від груп і коливалася в межах від  $0,21 \pm 0,30$  до  $0,23 \pm 0,031$  ммоль/л (табл. 2).

На початок дослідження концентрація фруктози в першій дослідній групі зменшилася в 1,29 рази і

становила  $0,24 \pm 0,028$  ммоль/л, а третій групі –  $0,24 \pm 0,029$  ммоль/л. Найбільше зниження вмісту фруктози в сперміях на початок дослідження спостерігалось в другій групі. Даний показник становив  $0,17 \pm 0,029$  ммоль/л ( $p < 0,01$ ), що у 1,82 рази менше, ніж в контролі.

В першій групі вміст фруктози у спермі на першу годину від початку дослідження знизився до  $0,14 \pm 0,030$  ммоль/л ( $p < 0,01$ ), що у 2,43 рази менше порівняно з контролем, і у 1,71 рази в порівнянні з попереднім показником ( $p < 0,01$ ). В дослідних зразках другої та третьої групи вміст фруктози на першу годину дослідження підвищився і коливався в межах від  $0,50 \pm 0,028$  до  $0,56 \pm 0,029$  ммоль/л.

В подальшому спостерігалось зниження концентрації фруктози в зразках першої групи до  $0,11 \pm 0,026$  ммоль/л, що у 4,27 рази менше ніж у контролі ( $p < 0,001$ ), а в другій групі у 1,81 рази ( $p < 0,01$ ).

На третю годину дослідження спостерігалось підвищення концентрації фруктози в контрольних зразках до  $0,66 \pm 0,028$  ммоль/л., а в дослідних зразках трьох дослідних груп був нижче і становив  $0,26 \pm 0,026$  ммоль/л (у 2,54 рази;  $p < 0,001$ ),  $0,13 \pm 0,026$  (у 5,08;  $p < 0,001$ ) та  $0,21 \pm 0,023$  (у 3,14 рази;  $p < 0,001$ ) відповідно.

Таблиця 2.

Динаміка концентрації фруктози в спермі за умов введення в склад середовища антиоксидантів

| Термін дослідження  | Контроль         | Групи                  |                        |                        |
|---------------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                     |                  | I                      | II                     | III                    |
| Натівна             | $0,25 \pm 0,003$ | $0,25 \pm 0,029$       | $0,21 \pm 0,030$       | $0,32 \pm 0,031$       |
| Початок дослідження | $0,31 \pm 0,029$ | $0,24 \pm 0,028$       | $0,17 \pm 0,029^{**}$  | $0,24 \pm 0,029$       |
| 1-а година          | $0,34 \pm 0,031$ | $0,14 \pm 0,030^{***}$ | $0,50 \pm 0,028$       | $0,56 \pm 0,029$       |
| 2-а година          | $0,47 \pm 0,030$ | $0,11 \pm 0,026^{***}$ | $0,26 \pm 0,028^{***}$ | $0,32 \pm 0,025$       |
| 3-я година          | $0,66 \pm 0,028$ | $0,26 \pm 0,026^{***}$ | $0,13 \pm 0,026^{***}$ | $0,21 \pm 0,023^{***}$ |
| 12-а година         | $0,40 \pm 0,023$ | $0,15 \pm 0,024^{***}$ | $0,40 \pm 0,026$       | $0,40 \pm 0,021$       |

Примітка: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

На дванадцятю годину дослідження достовірно нижчим залишалася концентрація фруктози в зразках першої дослідної групи, що у 2,66 рази менше ніж у контролі ( $p < 0,001$ ).

Відомо, що плазма сперми багата на фрук-

тозу, яка є головним енергетичним субстратом. Вміст фруктози в плазмі нативній спермі коливався в межах  $0,25 \pm 0,025$  ммоль/л до  $0,30 \pm 0,030$  ммоль/л (табл. 3).

Таблиця 3.

Динаміка концентрації фруктози в плазмі сперми за умов введення в склад середовища антиоксидантів

| Термін дослідження  | Контроль         | Групи                  |                        |                        |
|---------------------|------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                     |                  | I                      | II                     | III                    |
| Натівна             | $0,25 \pm 0,025$ | $0,25 \pm 0,030$       | $0,21 \pm 0,031$       | $0,30 \pm 0,030$       |
| Початок дослідження | $0,32 \pm 0,027$ | $0,24 \pm 0,029$       | $0,12 \pm 0,029^{***}$ | $0,24 \pm 0,030$       |
| 1-а година          | $0,34 \pm 0,030$ | $0,12 \pm 0,030^{***}$ | $0,50 \pm 0,03$        | $0,55 \pm 0,029$       |
| 2-а година          | $0,47 \pm 0,030$ | $0,11 \pm 0,028^{***}$ | $0,21 \pm 0,026^{***}$ | $0,32 \pm 0,024$       |
| 3-я година          | $0,65 \pm 0,028$ | $0,22 \pm 0,026^{***}$ | $0,23 \pm 0,024^{***}$ | $0,41 \pm 0,022^{***}$ |
| 12-а година         | $0,50 \pm 0,024$ | $0,50 \pm 0,021$       | $0,41 \pm 0,022$       | $0,43 \pm 0,020$       |

Примітка: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

На початок дослідження в контрольних зразках плазми сперми відмічається незначне підвищення вмісту фруктози до  $0,32 \pm 0,027$  ммоль/л. В зразках першої та третьої дослідних груп кон-

центрація фруктози дещо знижувалася, а найбільше зниження її вмісту спостерігалось в другій групі до  $0,12 \pm 0,029$  ммоль/л, що у 2,67 рази менше ніж в контролі ( $p < 0,001$ ).

В подальшому, вміст фруктози в плазмі сперми першої групи знижувався до  $0,11 \pm 0,028$  ммоль/л, ( $p > 0,001$ ), а в зразках другої та третьої груп становив  $0,21 \pm 0,026$  ммоль/л, ( $p > 0,001$ ) та  $0,32 \pm 0,024$  ( $p > 0,01$ ) відповідно.

На дванадцятую годину дослідження концентрація фруктози в плазмі сперми коливалася в межах від  $0,41 \pm 0,022$  до  $0,50 \pm 0,021$  ммоль/л.

**Перспектива досліджень.** Дослідження з цього напрямку дозволять виявити найбільш ефективні середовища для збереження сперми, підвищення життєздатності спермій.

#### **Висновки.**

1. Результати досліджень свідчать, що ви-

живаємість сперми після розведення в контрольних і дослідних зразках коливався в межах від  $5,3 \pm 0,14$  до  $5,4 \pm 0,08$  годин.

2. Показник абсолютної живучості спермій на початку досліджень коливався в межах від  $12,0 \pm 1,36$  до  $13,7 \pm 0,68$  годин.

3. Введення в склад середовища антиоксидантів та селену підвищив показник абсолютної живучості спермій в 1,14 – 1,23 рази ( $p < 0,05$ ).

4. В дослідних зразках спермій та плазми сперми вірогідно менше виявився вміст фруктози, що свідчить про зниження розщеплення цукру, як джерела енергії.

#### **Список використаної літератури:**

1. Осташко Ф.І., Борончук Г.В., Дмитренко Н.Г. та ін. Кріогенні зміни жирних кислот плазматичних мембран гамет бика і хряка. ВАСННІЛ, 1986.
2. Наук В.А., Величко І.Н., Сонельник В.Н. Методичні рекомендації по асептичному взяттю, обробці і використанні сперми виробників. Харків, 1974. – 17 с.
3. Ветеринарне акушерство, гінекологія і біотехнік розмноження. А.П.Студенцов, В.С.Шіпілов, В.Л.Нікітін, М.Т.Миромобов, 7-й випуск, перероб.і допов. – М.:Колос. 2000.
4. Гришко Д.С. Лекції з ветеринарного акушерства.: Навчальний посібник. – Х.: Прапор, 2003.
5. Інструкції зі штучного осіменіння корів і телиць. / Н.В.Зубець, В.П.Буркат, І.С.Воленко, В.П.Алейников та ін. – К., 200.
6. Основи штучного осіменіння і ветеринарно-зоотехнічного контролю відтворення стада. / В.О. Пабат, О.Г. Шафарук, В.О. Пасічник, Є.Ф. Томін, за ред.. В.О. Пабата. – К., 1997.
7. Осташко Ф.І. Біотехнологія виховання ВРХ. – М.: Росгоспвидавництво, 1976.
8. Полянцев Н.І., Підберезний В.В. Ветеринарія: акушерство і біотехніка репродукції тварин.: Навч. посібник – Ростов-на-Дону.: Фенікс, 2001.
9. Яблоський В.А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія тварин з основами андрології. – К.: Мета, 2002.
10. Осташко Ф.І., Бугров А.Д. Розмноження сперми биків в кипятку // Тези XXXIII щорічної конференції європейської асоціації по тваринництву. 19-20 серпня 1981.
11. Осташко Ф.І., Терещенко ВІ., Ісаченко В.В., Дахно Ф.Б., Сушко А.Б. Кріоконсервування частин трофобласта ВРХ // Сільськогосподарська біологія. – 1992, № 2.

*Результаты исследований, приведенные в статье, свидетельствуют, что введение в состав среды антиоксидантов и селена положительно влияет на сохранение подвижности сперматозоидов. Установлено, что после размораживания спермиев их живучесть увеличилась достоверно ( $p < 0,01$ ). Концентрация фруктозы в условиях добавления в среду антиоксидантов и селена в спермиях и плазме спермы достоверно снижается, что свидетельствует о снижении использования ими энергии.*

*The research results presented in the article indicate that the introduction of the composition environment antioxidant selenium and positive effect on sperm motility preservation. Found that sperm after thawing their vitality increased significantly ( $p < 0.01$ ). The concentration of fructose by the addition of antioxidants in the environment and selenium in sperm and sperm plasma significantly reduced, indicating reduction of their energy.*

Дата надходження в редакцію: 04.11. 2011 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Харенко М.І.